

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

SCUOLA DI DOTTORATO

Sanità e Produzioni Animali: Scienza, Tecnologia e Biotecnologie

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità' Pubblica Veterinaria

Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare

Dottorato di Ricerca In Igiene Veterinaria e Patologia Animale

XXIV Ciclo

**ESPRESSIONE DI MARKERS IMMUNOISTOCHIMICI  
IN GONADI NORMALI E PATOLOGICHE DI CANE**

VET 03

Docente Guida: Prof. Valeria Grieco

Coordinatore: Prof. Claudio Genchi

Tesi di: Dott. Barbara BANCO

Matricola n. R08103

ANNO ACCADEMICO 2010/11

Ogni nome è un uomo  
ed ogni uomo è solo quello che  
scoprirà inseguendo le distanze dentro sé.

(Negrita)

## INDICE

Premessa	Pag. 4
<b>Capitolo 1</b>	
Introduzione	Pag. 8
Scopo del Lavoro	Pag. 25
Materiali e Metodi	Pag. 26
Risultati	Pag. 28
Discussione	Pag. 36
<b>Capitolo 2</b>	
Introduzione	Pag. 41
Scopo del Lavoro	Pag. 49
Materiali e Metodi	Pag. 50
Risultati	Pag. 52
Discussione	Pag. 59
<b>Capitolo 3</b>	
Premessa	Pag. 66
Introduzione	Pag. 68
Scopo del Lavoro	Pag. 98
Materiali e Metodi	Pag. 99
Risultati	Pag. 101
Discussione	Pag. 107
Referenze bibliografiche	Pag. 111
Appendice	Pag. 150

## PREMESSA

Durante il triennio di dottorato, ho sviluppato ricerche riguardanti lo studio e la caratterizzazione delle alterazioni e delle neoplasie dell'apparato genitale degli animali da compagnia.

La maggior parte del mio lavoro è stata focalizzata sull'apparato genitale maschile, del quale è stata indagata la caratterizzazione immunofenotipica delle cellule del Sertoli canine (normali e neoplastiche), mentre, in un secondo momento, ci si è dedicati alla caratterizzazione immunofenotipica dei tumori ovarici del cane.

In questa specie, infatti, le lesioni testicolari riferibili a sertolioma sono più comuni che nell'uomo, ma a dispetto della maggiore incidenza, sono ben pochi gli studi che ne indagano gli aspetti istologici e soprattutto immunoistochimici. In medicina umana, al contrario, per quanto il sertolioma sia considerato un tumore raro, esiste un'ampia classificazione istologica di tali lesioni, fornita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), e numerosi lavori di immunoistochimica che ne indagano il fenotipo.

A tali pubblicazioni, inoltre, fanno da corollario altrettanti lavori inerenti il profilo morfologico ed immunoistochimico delle normali cellule del Sertoli, a partire dal periodo fetale per concludere con quello della maturità e senescenza. Tali informazioni sono di fondamentale importanza perché su queste ultime si basano ulteriori studi incentrati sulla caratterizzazione delle cellule del Sertoli di gonadi affette da condizioni patologiche responsabili di ipofertilità maschile quali il criptorchidismo, l'atrofia testicolare, le disfunzioni spermatogenetiche, la *Sertoli Cell only Syndrome* e varie cause di infertilità (Bergmann e Kliesch, 1994; De Miguel *et al.*, 1997; Steger *et al.*, 1999; Bar-Shira Maymon *et al.*, 2000). Tali patologie sono problematiche complesse che hanno assunto, nei paesi industrializzati, dimensioni sociali vere e proprie. Inoltre, è stato osservato come negli ultimi 30 anni, si sia verificato un incremento delle patologie del tratto riproduttivo maschile. Tali alterazioni, descritte con il termine di "testicular dysgenesis syndrome" (TDS), sono dovute all'assorbimento, da parte della donna gravida di un feto maschio, di contaminanti ambientali definiti "endocrine disruptors", gruppo eterogeneo e ancora incompletamente conosciuto di sostanze che spazia da contaminanti ambientali (fitosanitari, antiparassitari) a composti utilizzati in prodotti industriali e di largo consumo (ftalati). Gli endocrine disruptors alterano la connessione esistente tra le cellule di supporto (Sertoli) e le cellule germinali, che come tali, cessano la propria maturazione, mantengono caratteri di immaturità embrionale e sono in grado di persistere nei testicoli prepuberali ed adulti, incapaci, in

questo modo, di supportare una corretta spermatogenesi (ipofertilità/sterilità) e maggiormente esposti a trasformazione neoplastica (carcinoma in situ e seminomi invasivi).

L'integrazione dei dati di esposizione ambientale con dati epidemiologici sulle popolazioni animali, selvatiche e domestiche, nonché sull'uomo, è oggi considerato di primaria importanza per meglio comprendere i meccanismi eziopatogenesi alla base di tali alterazioni, sempre più diffuse.

Da anni, nell'istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanita' Pubblica Veterinaria, ci si è concentrati sullo studio delle neoplasie testicolari canine, in particolare del seminoma. Nel corso del mio dottorato, l'attenzione si è spostata sulla cellula protagonista del normale sviluppo testicolare, vale a dire la cellula del Sertoli, costituente strutturale del tubulo seminifero, che esplica numerosi ruoli, tra i quali quelli di supporto, nutrizione e secrezione ormonale.

Di questa cellula abbiamo indagato l'immunofenotipo, sia in condizioni di normalità che in condizioni patologiche, in modo tale da risalire alla sequenza temporale della comparsa di *markers* cellulari propri e poter fare chiarezza sul meccanismo che sta alla base della loro eventuale ri-espressione nei disturbi del testicolo adulto.

Per quanto invece riguarda la patologia ovarica canine, ci si è focalizzati sull'aspetto diagnostico delle neoplasie ovariche canine, entità abbastanza rare, poco sintomatiche e spesso tardivamente diagnosticate, per poterne rendere sempre più accurata la diagnosi istologica.

Lo scopo del mio lavoro è stato quello di ampliare il pannello immunoistochimico delineato per i tumori ovari del cane (Riccardi *et al.*, 2007), con l'impiego di un marker, l'HBME-1, scarsamente utilizzato in medicina veterinaria, ma che riveste un ruolo importante nella diagnostica differenziale dei tumori ovarici umani.

I risultati di questi studi sono stati oggetto di presentazioni a congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche con *impact factor* di rilevanza internazionale e verranno riportati per esteso nei seguenti capitoli:

- 1) Caratterizzazione istologica ed immunoistochimica delle cellule del Sertoli mature ed immature nella specie canine.

2) Caratterizzazione istologica ed immunohistochimica delle cellule del Sertoli neoplastiche nella specie canina

3) Studio immunohistochimico sull'espressione del marker HBME-1 nei tumori ovarici del cane

# **CAPITOLO 1**

**CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA**

**ED IMMUNOISTOCHEMICA**

**DELLE CELLULE DEL SERTOLI**

**MATURE ED IMMATURE NELLA SPECIE CANINA**

## INTRODUZIONE

### LE CELLULE DEL SERTOLI

Le cellule del Sertoli del testicolo di cane sono state le protagoniste indiscusse del mio dottorato, pertanto, prima di illustrare nel dettaglio gli studi che, in questi tre anni, le hanno riguardate, viene fornita un' introduzione su quelle che sono le loro caratteristiche anatomiche, morfologiche e funzionali. Tali informazioni sono di fatto essenziali per comprendere gli obiettivi del progetto di ricerca sviluppato durante il dottorato.

#### **Anatomia Microscopica ed Ultrastruttura delle Cellule del Sertoli**

Descritte per la prima volta da Enrico Sertoli nel 1865, le cellule del Sertoli svolgono un'importante funzione di nutrimento delle cellule della linea seminale. Costituendo gli elementi strutturali dell'epitelio seminifero, le cellule del Sertoli regolano il flusso di nutrienti e di fattori di crescita verso le cellule germinali aploidi attraverso le *tight junctions* della barriera emato-testicolare. L'andamento e la qualità della spermatogenesi sono determinati direttamente dal numero e dalla funzione delle cellule del Sertoli presenti (Sharpe *et al.*, 2003; Atassanova *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006).

Le cellule del Sertoli hanno anche un'altra importante funzione: giocano infatti un ruolo fondamentale nella formazione e nello sviluppo del testicolo nel feto e nella prima parte della vita postnatale (Hutchison *et al.*, 2008). Questi aspetti embriogenetici verranno descritti per esteso più avanti.

Durante la pubertà le cellule del Sertoli subiscono importanti cambiamenti morfologici, dovuti alla differenziazione da cellule immature in cellule adulte funzionalmente attive. Questa maturazione è essenziale per il normale sviluppo dei cordoni seminiferi che, nell'adulto, evolveranno in tubuli seminiferi funzionali (Steger *et al.*, 1999).

Le cellule del Sertoli immature presentano un nucleo allungato, con margini regolari e un piccolo nucleolo posto vicino alla membrana nucleare. Il citoplasma soprannucleare contiene abbondante reticolo endoplasmatico rugoso, un apparato di Golgi molto sviluppato e numerose vescicole; il citoplasma basale è caratterizzato dalla presenza di microfilamenti disposti in fasci. Il reticolo endoplasmatico rugoso (RER) si rende evidente, nell'uomo, già all'ottava settimana di gestazione (Francavilla *et al.*, 1990). Le cellule del Sertoli bovine, suine, ovine e caprine hanno abbondante RER, con molte

cisterne flaccide o rigonfie che riempiono fittamente il loro citoplasma. Viceversa, il RER è meno sviluppato nelle cellule umane, feline, murine e di coniglio, nelle quali è limitato a poche e piccole vescicole o lamine (Tran *et al.*, 1987).

In ogni parte del citoplasma sono omogeneamente distribuiti mitocondri, vescicole di reticolo endoplasmatico liscio, lisosomi, desmosomi e goccioline lipidiche. Non sono presenti complessi giunzionali tra cellule immature. La maturazione delle cellule del Sertoli è accompagnata dalla perdita dell'attività mitotica prima dell'inizio della spermatogenesi (Nistal *et al.*, 1982; Sharpe *et al.*, 2003; Brehm *et al.*, 2006).

La compartimentalizzazione del citoplasma delle cellule del Sertoli è essenziale. Essa è funzionale alle esigenze fisiologiche dei vari stadi maturativi delle cellule germinali contenute nelle numerose invaginazioni citoplasmatiche, vere e proprie nicchie, che caratterizzano le cellule adulte (Banks, 1991).

Le cellule del Sertoli mature si estendono dalla lamina basale al lume dei tubuli seminiferi; sono alte, a contorno irregolare, con un nucleo di forma variabile (ovoidale, piramidale, triangolare), in genere in posizione basale, e con un evidente nucleolo. Il profilo nucleare può presentare numerose e larghe fessure, dove il citoplasma sembra dividere profondamente il nucleo, dando l'impressione che esso sia lobato. Spesso è presente anche un moderato numero di pori nucleari e una fine trama granulare caratterizza il contenuto interno del nucleo (Russel, 1993).

La membrana basale può presentare una caratteristica intaccatura o piega longitudinale. Lungo la superficie basale è presente abbondante reticolo endoplasmatico liscio (REL) (tubulare, vescicolare, sacciforme, spiraliforme). Ritenuto responsabile della capacità di queste cellule di produrre steroidi, il REL spesso è concentrato a livello della parte apicale della cellula del Sertoli, dove questa è unita agli ultimi spermatidi prima della liberazione. Il reticolo endoplasmatico rugoso si trova solamente a livello di citoplasma basale. (Banks, 1991)

L'apparato di Golgi è esteso e si trova in posizione soprannucleare associato a volte alla presenza di un centriolo, anche se una parte può occasionalmente trovarsi lateralmente o in posizione basale rispetto al nucleo. L'apparato di Golgi è composto da più elementi disseminati in ogni parte del citoplasma basale: si tratta di tipiche zone sacciformi, impilate e interconnesse da tubuli anastomotici (Russel, 1993).

Sparsi nella cellula, particolarmente lungo i margini laterali, si trovano numerosi citofilamenti, alle cui modificazioni sono attribuibili i cambiamenti di forma delle cellule del Sertoli e di conseguenza il movimento dei vari stadi delle cellule germinali dalla base verso il bordo apicale (Banks, 1991).

Nella porzione basale della cellula e nella sua porzione apicale, in prossimità delle teste degli spermatidi, sono inoltre presenti lisosomi a vari stadi, in relazione alla rimozione, alla fagocitosi e alla digestione di frammenti di citoplasma derivanti dagli spermatozoi in via di sviluppo. Il numero di lisosomi è fluttuante e la loro localizzazione si modifica in relazione agli eventi ciclici che si verificano durante la spermatogenesi. La cellula del Sertoli contiene la famiglia degli organelli lisosomi-associati che include corpi multivescicolari, vacuoli autofagici ed eterofagici, connessi alla fagocitosi e all'eliminazione dei corpi residui e delle cellule germinali degenerate. Inoltre è stata dimostrata, all'interno dei lisosomi, la presenza di enzimi come fosfatasi acida e arilsulfatasi.

I mitocondri delle cellule del Sertoli sono numerosi e disseminati in ogni parte della cellula; la forma delle loro creste in molte specie è tubulare o di tipo misto, e la matrice risulta essere più densa rispetto a quella dei mitocondri dei tipi cellulari vicini.

Per quanto riguarda il glicogeno, esso è presente in abbondante quantità nelle cellule del Sertoli del cane e la sua distribuzione è uniforme all'interno della cellula.

I lipidi si trovano generalmente nella porzione basale della cellula, tra il nucleo e la superficie basale o lateralmente al nucleo. Essendo questi presenti nel periodo che segue la fagocitosi dei corpi residui, inducono a supporre che il loro accumulo sia il risultato della rottura dei corpi residui. Considerato che le goccioline lipidiche vengono gradualmente riassorbite dalle cellule del Sertoli, ne è stato ipotizzato un possibile riutilizzo da parte delle cellule germinali in maniera ciclica (Russel, 1993).

Le membrane cellulari laterali di cellule del Sertoli adiacenti si uniscono nella porzione basale per mezzo di giunzioni occludenti, che dividono i tubuli seminiferi in due distinte regioni: il compartimento basale (dove si trovano gli spermatogoni che sono direttamente esposti all'influenza delle varie sostanze che provengono dall'interstizio) e il compartimento apicale (che contiene gli elementi della linea germinale negli stadi successivi di sviluppo) (Banks, 1991).

A livello della giuntura tra tubuli seminiferi e rete testis si osserva una graduale perdita di cellule germinali; a questo livello, dunque, rimangono solo cellule del Sertoli e occasionalmente spermatogoni. Si può inoltre notare un passaggio dall'irregolare epitelio colonnare delle cellule del Sertoli all'epitelio cuboidale dei tubuli retti connessi alla rete testis: questa regione viene chiamata *segmento terminale o zona di transizione*. Qui le cellule del Sertoli non sono più orientate in modo centripeto, ma sono inclinate nella direzione del flusso del fluido e dimostrano ampi vacuoli e spermatozoi fagocitati (Russel, 1993).

Mentre la cellula del Sertoli è direttamente influenzata dagli scambi con il sangue circolante, le cellule germinali, con l'esclusione degli spermatogoni, sono isolate da influenze dirette grazie proprio alla cellula del Sertoli e alle giunzioni occludenti tra cellule contigue, che formano un'efficace barriera emato-testicolare (Petersen *et al.*, 2006). E' stato osservato per la prima volta nel ratto che questa barriera si stabilisce tra i 16 e 19 giorni post-partum ed in contemporanea è stato anche rilevato il declino dell'attività di inibizione dei dotti paramesonefrici, cioè i dotti di Müller (Vitale *et al.*, 1973; Picon *et al.*, 1978). E' possibile che questa barriera possa impedire al fattore inibitorio di fuoriuscire dai tubuli seminiferi ed essere responsabile dell'apparente declino, durante il periodo post-natale, dell'attività di inibizione sui dotti paramesonefrici che esercita il testicolo (Picon *et al.*, 1978).

## **Fisiologia-Endocrinologia**

Il testicolo, oltre ad avere funzione gametogonica, produce sostanze ormonali ed è strettamente dipendente per la sua regolazione dall' ipotalamo e dall' ipofisi, per cui si parla di *asse ipotalamo-ipofisi-testicolo* (Aguggini *et al.*, 1992).

La secrezione ipotalamica di GnRH determina la liberazione ipofisaria di LH (o ICSH: Interstitial Cells Stimulating Hormone) e di FSH (Follicle Stimulating Hormone). L'LH a sua volta determina la liberazione di testosterone da parte delle cellule di Leydig, mentre l'FSH stimola la liberazione, da parte delle cellule del Sertoli, dell'ABP (Androgen Binding Protein), del DHT (Diidrotestosterone) e degli estrogeni. Questi ultimi intervengono nel feed-back negativo sulla liberazione ipotalamica di GnRH e dell'inibina, che a sua volta determina l'inibizione, principalmente a livello ipofisario, della liberazione di FSH. Il testosterone inibisce direttamente la liberazione ipotalamica di GnRH. A regolare la secrezione di GnRH interviene anche la stessa concentrazione ipotalamica di GnRH ed il livello di LH ipofisario.

L'FSH è l'ormone più importante che regola il funzionamento della cellula del Sertoli, l'unico tipo di cellula testicolare che presenta recettori per questo ormone (Steger *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2006). Qui, l'FSH agisce anche attraverso sistemi enzimatici collegati all'adenilato ciclastasi. Sotto l'influenza dell'ormone ipofisario, le cellule di Sertoli secernono ABP e aromatizzano il testosterone in estrogeni (Gunsalus *et al.*, 1981; Setchell *et al.*, 1983). Un'adeguata stimolazione da parte dell'FSH è necessaria per permettere alle cellule del Sertoli di sostenere la spermatogenesi. Alcuni studi (Baird *et al.*, 1991) suggeriscono che la produzione di lattato e piruvato, che agiscono da substrato energetico per le cellule germinali, sia il ruolo fondamentale delle cellule del Sertoli stimulate dall'FSH nel mantenimento della spermatogenesi. A sua volta la secrezione di FSH è regolata sia dagli steroidi sessuali sia dall'inibina (Arthur *et al.*, 2001). E' stata dimostrata l'importanza della concentrazione neonatale di FSH, la cui soppressione causa una riduzione del numero finale di cellule del Sertoli pari al 40%, mentre l'incremento, ottenuto sperimentalmente con iniezione dell'ormone stesso, le fa aumentare del 18-49% (Sharpe *et al.*, 2003). Pur essendo importanti nel processo di crescita delle cellule del Sertoli, le gonadotropine non rivelano alcuna correlazione con l' AMH secreto dalle stesse cellule del Sertoli, né nel caso di normale raggiungimento della pubertà, né in caso di pubertà precoce (Rey *et al.*, 1993).

Elevati livelli di TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) possono interagire con i recettori per l'FSH, offrendo così una possibile spiegazione per l'aumentata proliferazione delle cellule del Sertoli immature osservata in relazione a ipotiroidismo indotto

sperimentalmente, in cui il numero di cellule del Sertoli presente nell'adulto risulta aumentato dell' 82-157% (Petersen *et al.*, 2006; Sharpe *et al.*, 2003), mentre in caso di ipertiroidismo neonatale indotto, la quantità di cellule del Sertoli risulta dimezzata (Sharpe *et al.*, 2003).

Un ruolo molto importante è svolto anche dall'ormone tiroideo T3, in quanto interagisce con gli androgeni, e probabilmente con l'FSH, determinando la maturazione finale delle cellule del Sertoli. *In vitro* si è visto anche che l'ormone tiroideo (T3) induce l'espressione dell'AR (Androgen Receptor) nelle cellule del Sertoli immature, mentre inibisce l'espressione dell'AMH (Sharpe *et al.*, 2003; Atassanova *et al.*, 2005).

La complessa attività endocrina del testicolo viene supportata anche dalle cellule di Leydig nel tessuto interstiziale e dalle cellule del Sertoli nei tubuli seminiferi (Aguggini *et al.*, 1992; Petersen *et al.*, 2006).

Le cellule di Leydig sono coinvolte nella produzione di testosterone, ormone steroideo prodotto sotto l'azione delle gonadotropine ipofisarie. L'ormone che regola la produzione di testosterone è l'LH, una gonadotropina i cui recettori specifici si trovano sulla membrana plasmatica delle cellule di Leydig. La quantità di tali recettori viene aumentata da vari ormoni quali lo stesso LH, l'FSH e la PRL (Prolattina), mentre viene inibita dal cortisolo. Il testosterone nel maschio è determinante per il mantenimento della spermatogenesi, agendo sulla divisione meiotica e sulla corretta differenziazione morfologica degli spermatozoi.

Le cellule del Sertoli producono estrogeni e diidrotestosterone (DHT). In sostanza queste cellule ricevono il testosterone dalle cellule di Leydig e lo convertono da una parte in estradiolo e dall'altra in DHT.

Le cellule del Sertoli producono inoltre:

- **INIBINA**, un ormone proteico che gioca un ruolo determinante a livello ipofisario con effetto feed-back negativo sull'FSH, lasciando inalterato il livello di LH. In particolare, la misurazione delle concentrazioni ematiche di INIBINA B nell'uomo, nei primati e nel ratto può essere un efficace metodo per determinare la presenza di un deficit nel numero, nella funzione o nella maturazione delle cellule del Sertoli (Sharpe *et al.*, 2003);
- **Androgen Binding Protein (ABP)**, una proteina che lega il testosterone e il DHT, aumentandone la concentrazione a livello tubulare ed epididimale;
- un **attivatore del plasminogeno**, che interviene nella regolazione dell'apertura delle giunzioni serrate tra le cellule del Sertoli durante il passaggio degli spermatozoi primari dal compartimento basale a quello luminale;

- **Anti Müllerian Hormone (AMH)**, una proteina che inibisce lo sviluppo dei derivati del dotto del Müller durante la differenziazione della gonade maschile (Rey, 2005);
- **Gonadocrinina**, una sostanza GnRH-simile, con la probabile funzione di regolare la secrezione androgena con un breve circuito intratesticolare, mediante inibizione dell'attività delle cellule di Leydig (Aguggini *et al.*, 1992).

Le cellule del Sertoli , oltre che per l'FSH, presentano altri recettori:

- per la prolattina;
- per l'ormone della crescita;
- per il testosterone (AR, Androgen Receptor): questo recettore è essenziale per un adeguato funzionamento della barriera emato-testicolare, ma anche per la meiosi e per un adeguato sviluppo delle cellule germinali;
- per gli estrogeni (ER- $\beta$ , estrogen receptor  $\beta$ );
- per i fattori di crescita (FGF-1,2 Fibroblast growth factors, IGF-1,2 Insuline like growth factors, EGF Epidermal growth factor), che svolgono un ruolo importante nello sviluppo e nella maturazione delle cellule del Sertoli.
- per le citochine infiammatorie (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), che in coltura sembrano stimolare la crescita di cellule del Sertoli immature (Petersen e Soder, 2006).

## **Embriogenesi delle Cellule del Sertoli**

La cellula del Sertoli è molto di più che una semplice impalcatura che consente la spermatogenesi. La sua complessità e importanza risulta chiara specialmente quando si esamina la sua embriologia (Pelliniemi *et al.*, 1993).

Tra il 1940 e il 1950 Alfred Jost affermò che la composizione dei cromosomi sessuali controlla il sesso della gonade, la quale infine determina il sesso fenotipico dell'embrione (Jost, 1947; Jost, 1953).

La presenza del cromosoma Y o meglio della SRY ( Sex determining Region of the Y chromosome) attiva una cascata di eventi molecolari e cellulari che conducono alla differenziazione di vari tipi cellulari somatici tra cui, appunto, le cellule del Sertoli e all'organizzazione della struttura testicolare (Barsoum *et al.*, 2006). In effetti, la funzione chiave dell'SRY è di avviare la differenziazione delle cellule suddette (responsabili a loro volta della morfogenesi testicolare) in modo indiretto attraverso un altro fattore di trascrizione, definito SOX9 (SRY-box containing gene9) (Barsoum *et al.*, 2006). Basti pensare che questo gene è in grado ed è sufficiente da solo ad indurre la formazione del testicolo nel topo (Bergstrom *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2004). L'SRY utilizza sia un meccanismo cellulare autonomo sia una via paracrina per indurre la differenziazione ed espansione della popolazione delle cellule del Sertoli, indispensabili esse stesse per la regolazione della differenziazione delle cellule di Leydig (la fonte fetale di androgeni) che infatti non esprimono l'SRY o il Sox9 (Barsoum *et al.*, 2006).

La presenza di cellule del Sertoli e di cellule di Leydig, all'interno della gonade embrionale, garantisce la produzione di AMH (originario dalle cellule del Sertoli) e di androgeni (originari dalle cellule interstiziali di Leydig), responsabili rispettivamente della regressione del dotto di Müller e del mantenimento di quello di Wolff, l'uno precursore dell'apparato genitale femminile, l'altro di quello maschile (Barsoum *et al.*, 2006).

Lo sviluppo morfologico sessuale dell'uomo può essere diviso in 4 stadi, lo stadio pregonadico, lo stadio indifferenziato, lo stadio di differenziazione sessuale primitiva e lo stadio di differenziazione sessuale secondaria (Wartenberg, 1989; Rabinovici *et al.*, 1991).

Lo stadio pregonadico, determinato a livello genetico, inizia a 4 giorni e mezzo, quando, nella blastocisti, si assiste alla differenziazione delle cellule germinali primordiali. Il periodo della gonade indifferenziata inizia con lo sviluppo delle creste gonadiche e dura circa 7-10 giorni: la gonade indifferenziata è caratterizzata da rapida

proliferazione e assottigliamento della cresta gonadica e del suo epitelio celomatico. La gonade in via di formazione appare, in questo stadio, come un lievissimo rigonfiamento ventro-mediale a livello della superficie celomatica dei mesoneftri. E' ancora una gonade "indifferenziata", identica per entrambi i sessi (Jost *et al.*, 1973; Capel., 2000)

Allo stesso tempo, le cellule germinali primordiali, incominciano a migrare dal sacco vitellino dell'embrione all'epitelio celomatico della cresta urogenitale. Entro le 5-6 settimane di gestazione, la gonade indifferenziata è composta da cellule germinali primordiali e dal mesenchima della cresta gonadica. Uno dei primi segni morfologici della differenziazione sessuale primaria maschile è la comparsa delle cellule del Sertoli, a 6-7 settimane di gestazione. Tali cellule, oltre a svolgere azione di sostegno, hanno un ruolo nutritivo e di mantenimento nei confronti delle cellule germinali di entrambi i sessi (Wilhelm *et al.*, 2007). Ogni cellula del Sertoli ha una predeterminata capacità di supportare un certo numero di cellule seminali, che differisce di specie in specie ma anche di soggetto in soggetto (Sharpe, 1994; Sharpe, 1999; McCoard *et al.*, 2001). L'aggregazione di tali cellule alle cellule germinali dà origine ai cordoni sessuali. Verso l'ottava settimana si assiste alla differenziazione delle cellule somatiche mesenchimali nelle cellule di Leydig, cellule produttrici di androgeni (Wilhelm *et al.*, 2007).

Durante la differenziazione sessuale secondaria, gli effetti endocrini e paracrini degli ormoni sessuali (testosterone dalle cellule di Leydig e AMH dalle cellule del Sertoli) causa la stabilizzazione, nel feto maschile, dei dotti di Wolff e la regressione dei dotti di Müller (Voutilainen, 1992).

Da questa breve introduzione, si evince che le cellule del Sertoli sono le prime ad andare incontro a differenziazione nella gonade fetale rendendo possibile la formazione dei tubuli seminiferi e, in seguito, promuovendo la differenziazione delle cellule di Leydig e bloccando l'entrata in meiosi delle cellule germinali. Infatti, nel periodo fetale, le cellule del Sertoli lavorano attivamente per ostacolare la spermatogenesi, ma allo stesso tempo devono supportare fisicamente e metabolicamente le cellule germinali e consentirne la differenziazione (Pelliniemi *et al.*, 1993; Sharpe *et al.*, 2003; O'Shaughnessy *et al.*, 2007).

## **Proliferazione e Maturazione Strutturale e Funzionale delle Cellule del Sertoli**

Dalle numerose conoscenze acquisite a proposito delle cellule del Sertoli, si evince che la loro maturazione, fino al raggiungimento della piena funzionalità, è un processo multi-step nel quale ciascun grado di accrescimento deve avvenire in modo corretto per non precludere il compimento delle fasi successive.

La maturazione delle cellule del Sertoli coincide con la perdita della capacità proliferativa di queste cellule, attestata, nelle varie specie, fino alla fase neonatale (Sharpe *et al.*, 2003). Nell'uomo la fase di massima proliferazione delle cellule del Sertoli è stata segnalata da Cortes e collaboratori (1987) durante il tardo periodo fetale, più precisamente è stata osservata da Hilscher *et al.* (1992) nel feto, dalla 22esima settimana di gestazione in poi, simultaneamente all'arresto dell'intensa proliferazione delle cellule germinali. Una seconda fase di proliferazione, inoltre, è segnalata, nell'uomo e avviene molti anni successivamente alla prima, ovvero in età peripuberale (Cortes *et al.*, 1987; Sharpe *et al.*, 2003). Pertanto, il numero definitivo di cellule del Sertoli risulta già determinato prima dell'età adulta. In età postpuberale, infatti, esso rimane stabile (Rowley *et al.*, 1971; Steinberger *et al.*, 1971; Nistal *et al.*, 1982; Aguggini *et al.*, 1992; Sharpe *et al.*, 2003; Rey, 2005; Petersen *et al.*, 2006). Con il processo di invecchiamento, il rapporto cellule del Sertoli e cellule seminali rimane costante, pur registrando una riduzione di cellule del Sertoli per sezione di tubulo seminale (Johnson *et al.*, 1984).

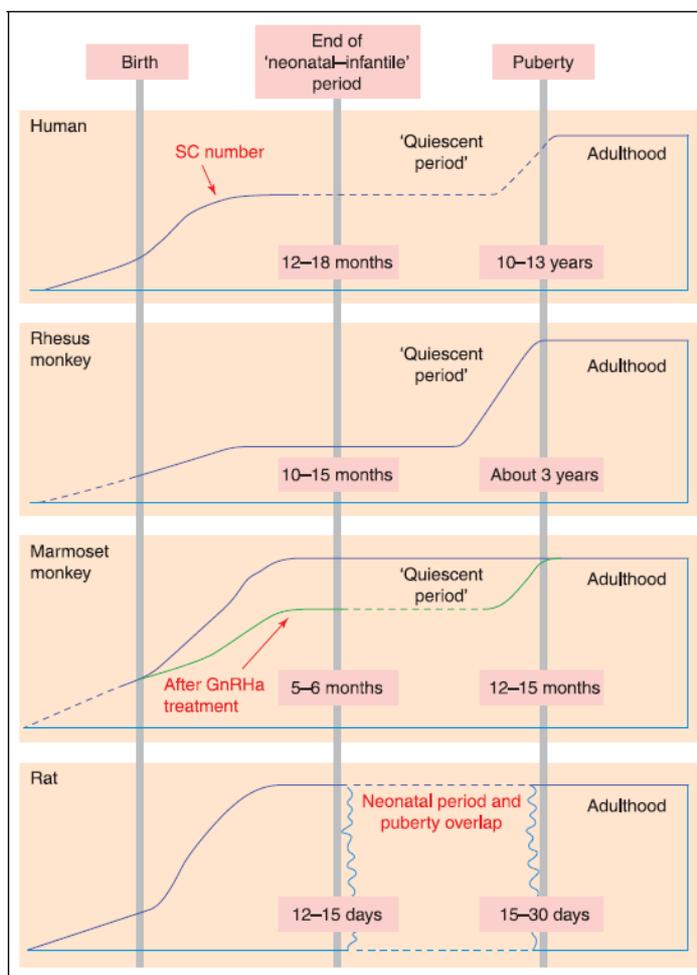
In base alle tempistiche di accrescimento e di raggiungimento dell'età adulta, le varie specie presentano tempistiche di proliferazione delle cellule del Sertoli assai diverse (Fig.1):

- nei roditori la fase proliferativa è concentrata nel periodo fetale e neonatale (Sharpe *et al.*, 2003);
- nella "scimmia rhesus", la proliferazione maggiore si verifica nel periodo peripuberale (Marshall *et al.*, 1996; Mann *et al.*, 1997);
- nel ratto, dal momento che le varie fasi della crescita, si sovrappongono, risulta indaginoso e quasi impossibile definire con certezza un periodo specifico (Wang *et al.*, 1989);
- nel toro e nel suino i picchi di proliferazione si registrano nei periodi neonatale e peripuberale. (De Franca *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda il cane, non sono ad oggi disponibili dati comparabili a quelli delle suddette specie.

**Fig.1: Tempistiche di proliferazione delle cellule del Sertoli**

Diagramma schematico che illustra le tempistiche di proliferazione delle cellule del Sertoli (SC) nell'uomo, nella scimmia rhesus e marmoset e nel topo in relazione alla nascita, al periodo neonatale e alla pubertà (Sharpe *et al.*, 2003). La linea blu scuro indica il cambiamento relativo del numero di cellule del Sertoli in queste specie, basato su dati bibliografici (Cortes *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1989; Marshall *et al.*, 1996; Mann *et al.*, 1997; Sharpe *et al.*, 2000); ove manchino delle informazioni, è mostrata una linea blu tratteggiata. Si noti che, nel ratto, la fine del periodo neonatale e l'avvento della pubertà si sovrappongono quindi il numero di cellule del Sertoli adulte è già definito alla fine del "periodo neonatale". La linea verde mostrata nel grafico relativo alla scimmia "marmoset" indica cosa accade al numero di cellule del Sertoli in animali trattati dalla nascita fino alla fine del periodo neonatale con GnRH antagonisti per sopprimere la secrezione ipofisaria di gonadotropine.



Durante il periodo postnatale, le cellule del Sertoli subiscono importanti modificazioni strutturali e morfologiche, fondamentali sia per la differenziazione prepuberale

del testicolo che per l'inizio della spermatogenesi. Le cellule, inizialmente di forma rotonda o ovale, assumono un aspetto più affusolato e si proiettano dalla membrana basale all'interno del lume tubulare. Esse, inoltre, aumentano di dimensioni e si dotano di prolungamenti citoplasmatici per accogliere le cellule germinali in via di differenziazione. I nuclei diventano più allungati, con numerose indentature ed evidenti nucleoli. Durante il primo periodo postnatale, si possono osservare con facilità figure mitotiche a carico delle cellule del Sertoli. L'attività mitotica, in seguito, diminuisce gradualmente, fino a scomparire non appena ha inizio la spermatogenesi (Pelliniemi *et al.*, 1993). Le cellule del Sertoli adiacenti formano *tight junctions* (giunzioni occludenti) le une con le altre in modo tale da creare un compartimento intraluminale ben definito, nel quale possano progredire gli stadi meiotico e post-meiotico della spermatogenesi e permettendo al contempo che il lume dei tubuli si riempia di liquido. Come risultato, le cellule germinali che si accrescono nel comparto intraluminale risultano a tutti gli effetti escluse dall'accesso diretto ad alcuni nutrienti presenti nel sangue periferico, e

pertanto dipendono interamente dalle secrezioni delle cellule del Sertoli stesse (Sharpe *et al.*, 2003).

Nel corso della loro maturazione, oltre all'aspetto morfologico, le cellule del Sertoli modificano l'espressione di alcuni markers proteici, abbandonandone alcuni ed acquisendone altri ex-novo.

Più precisamente:

#### ◆ **Citocheratine**

Le citocheratine (CKs) sono markers epiteliali (Paranko *et al.*, 1986; Aümuller *et al.*, 1988). Esse rappresentano una complessa famiglia di proteine differenti nel pH, acide o basiche, e nel Peso Molecolare (PM). Le CKs sono contraddistinte da un numero (da 1 a 20) che risulta inversamente proporzionale al loro PM, che varia da 40 a 68 Kd (Moll *et al.*, 1982). Per formare un filamento sono necessarie almeno 2 CKs, una acida e una basica. Pertanto, ogni cellula epiteliale esprime almeno una coppia di CKs (Moll *et al.*, 1982). Tali coppie, però, non si formano a caso, esistono dei veri e propri "Keratins pairs" che ricorrono con frequenza come, ad esempio CK8-CK18 (Cooper *et al.*, 1985). Tali coppie risultano spesso conservate cosicché, ad esempio, se si rileva immunostochimicamente la presenza in una cellula di CK18 si può, se non affermare, per lo meno supporre che tale cellula esprima anche la CK8 (Cooper *et al.*, 1985).

Le citocheratine vengono espresse dalle cellule del Sertoli durante la differenziazione prenatale e prepuberale e sono perse normalmente alla pubertà (Stosiek *et al.*, 1990; Steger *et al.*, 1996; Bar-Shira Maymon *et al.*, 2000; Sharpe *et al.*, 2003).

In particolare, in medicina umana, la CK8-18 è considerata uno dei primi marker espressi dalle cellule del Sertoli immature, ancora disposte, all'interno del tubulo, in assetto epiteliale. La perdita della CK18 avviene molto precocemente: è stata dimostrata la sua presenza dalle 12 fino alle 20 settimane di gestazione (Rogatsch *et al.*, 1996; Franke *et al.*, 2004). Pertanto, l'espressione di tale marker, per quanto transitorio ed esclusivo delle prime fasi dell'ontogenesi, non potrebbe supportare l'ipotesi che le cellule del Sertoli abbiano origine epiteliale, ma può essere utilizzato come marker di maturazione, in quanto può segnalare il passaggio primitivo di queste cellule ad uno stadio funzionale (Rogatsch *et al.*, 1996; Steger *et al.*, 1999). Infatti, secondo Viebahn e collaboratori (1988), l'espressione, all'interno della cellula del Sertoli, di filamenti intermedi così diversi, sta proprio ad indicare il passaggio attraverso stadi funzionali via via differenti.

Il fatto che le cellule del Sertoli mantengano o riacquistino un aspetto indifferenziato, tornando ad esprimere la CK18, si verifica in diverse condizioni patologiche come ad esempio il criptorchidismo, l'atrofia testicolare, l'infertilità e diversi tipi di neoplasia testicolare come i tumori delle cellule germinali e i tumori maligni delle cellule del Sertoli (Miettinen *et al.*, 1985; Nielsen e Jacobsen, 1988; Stosiek *et al.*, 1990; Bergmann e Kliesch, 1994; Steger *et al.*, 1996; De Miguel *et al.*, 1997; Steger *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004).

#### ◆ **Vimentina**

Contrariamente alle citocheratine che sono molteplici, la vimentina è un'unica proteina, marker tipico dei derivati mesodermici tra cui c'è anche il testicolo.

Le cellule del Sertoli contengono numerosi filamenti intermedi che formano una rete che si estende attraverso l'intero citoplasma. Il tipo di filamento intermedio predominante nelle cellule del Sertoli mature dell'adulto è la vimentina (VIM) e indica l'origine mesenchimale di queste cellule (Aümuller *et al.*, 1988; Bergmann e Kliesch, 1994; Bar-Shira Maymon *et al.*, 2000).

I filamenti di vimentina sono abbondanti intorno al nucleo e da qui si irradiano verso la periferia della cellula (De Miguel *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004); alcuni si estendono verso la membrana plasmatica laterale, altri filamenti si estendono alla regione basale della cellula, mentre nella regione apicale altri ancora corrono in parallelo con i microtubuli; questi sono allineati parallelamente all'asse lungo delle cripte apicali che contengono le teste degli spermatozoi. Mentre i microtubuli provvedono al supporto strutturale per lo sviluppo delle cellule germinali, i filamenti di vimentina hanno un ruolo fondamentale nel regolare i rapporti tra le cellule di Sertoli (De Miguel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002). L'immunoreattività alla vimentina fornisce un nitido profilo della forma delle cellule del Sertoli con l'eccezione del nucleo, che manca di immunoreattività. Il vantaggio dell'utilizzo della vimentina negli studi immunoistochimici è la possibilità di poter valutare i cambi di forma della cellula in base al suo stato funzionale e a condizioni patologiche, come ad esempio il criptorchidismo, messo in evidenza da un'alterata distribuzione dei filamenti di vimentina nelle cellule del Sertoli (Wang *et al.*, 2002, Aümuller *et al.*, 1988).

Le cellule del Sertoli sono le uniche cellule immunoreattive alla vimentina all'interno dei tubuli seminiferi (Aümuller *et al.*, 1988; Bergmann e Kliesch, 1994; Bar-Shira Maymon *et al.*, 2000). Tale marker viene espresso molto precocemente, già quando, a livello di gonade bipotente, le cellule del mesoderma vanno in contro a differenziazione, e

continuerà ad essere espresso per tutto lo sviluppo del testicolo, fino alla maturità e alla senescenza (de Miguel *et al.*, 1997).

In molte specie, durante lo sviluppo dei cordoni sessuali, le cellule del Sertoli co-esprimono questo marker ad altri (desmina e citocheratina 8/18) (Paranko *et al.*, 1986; Stosiek *et al.*, 1990; Fridmacher *et al.*, 1992; Bergmann e Kliesch, 1994; Rogatsch *et al.*, 1996; De Miguel *et al.*, 1997).

Pertanto, si può concludere che, per quanto riguarda i filamenti intermedi citoplasmatici, le cellule del Sertoli immature esprimono sia citocheratine che vimentina e che in seguito, nella gonade adulta, esse sono positive solo per vimentina (Franke *et al.*, 1979; Stosiek *et al.*, 1990; Aumüller *et al.*, 1992).

Si torna di nuovo ad assistere alla co-espressione di questi markers in caso di senilità, infertilità, criptorchidismo o lesioni tumorali (Miettinen *et al.*, 1985; Stosiek *et al.*, 1990; Rogatsch *et al.*, 1996; Steger *et al.*, 1996).

#### ◆ **Desmina**

E' stato dimostrato, nel ratto, come questo marker sia tipico delle cellule peritubulari mioidi del testicolo (Zhang *et al.*, 2004), ma anche delle cellule muscolari lisce cardiache, scheletriche, viscerali e vascolari (Virtanen *et al.*, 1986; Aümüller *et al.*, 1992; Rogatsch *et al.*, 1996). La desmina è espressa, per un breve periodo, nelle primissime fasi dell'organogenesi del testicolo, quando ancora la gonade è indifferenziata. La sua espressione, da parte delle cellule del Sertoli, è transitoria e precocissima, addirittura precedente alla comparsa delle citocheratine: sono infatti i cordoni sessuali, nelle prime fasi del loro sviluppo, che esprimono vimentina e desmina, la quale, successivamente, verrà sostituita dall'espressione di citocheratine (Fröjdman *et al.*, 1989). Tale espressione si accompagnerà prima alla formazione della membrana basale, e poi alla formazione della tunica albuginea, la quale separerà i cordoni sessuali dall'epitelio superficiale del testicolo (Paranko *et al.*, 1986; Fröjdman *et al.*, 1989).

Ancora una volta, la dinamicità dell'espressione e della distribuzione dei diversi filamenti intermedi all'interno della cellula del Sertoli, correlano non solo con i mutamenti di forma e dimensione a cui queste cellule vanno incontro, durante il loro sviluppo, ma anche con la polarizzazione cellulare che è alla base di tutte le interazioni funzionali che questa cellula esplica all'interno del testicolo (Fröjdman *et al.*, 1989).

Inoltre, dal momento che la desmina reagisce con cellule di origine muscolare, essa marca le cellule mioidi presenti nello stroma che avvolge i tubuli seminiferi del testicolo

normale, del testicolo criptorchide (Zhang *et al.*, 2004) e del testicolo neoplastico (Patnaik e Mostofi, 1993).

#### ◆ **NSE (Neuron Specific Enolase)**

Nell'uomo è stato dimostrato, da un unico studio di Patnaik e Mostofi (1993), che nel testicolo adulto le cellule del Sertoli sono le uniche ad essere immunoreattive per NSE. L'NSE viene utilizzato insieme alla vimentina nelle colorazioni immunohistochimiche per dimostrare l'esistenza di una doppia popolazione di cellule nei tumori a cellule miste (seminoma/sertolioma): si nota infatti positività all'NSE e alla vimentina delle cellule del Sertoli mentre le cellule germinali sono del tutto negative ad entrambi i markers (Patnaik e Mostofi, 1993).

#### ◆ **Inibina- $\alpha$**

Ormone gonadico glicoproteico eterodimerico composto da una subunità  $\alpha$  e da 1 o 2 possibili subunità  $\beta$  ( $\beta A$  o  $\beta B$ ), unite da ponti disolfuro; perciò esistono 2 isoforme: inibina A e inibina B. L'inibina ha la capacità di inibire selettivamente la secrezione di FSH (Follicle-stimulating Hormone) ipofisiario e ha un'importante funzione regolatoria paracrina in diversi organi/tessuti durante la vita fetale, neonatale e adulta. L'inibina è secreta dalle cellule della granulosa dei follicoli ovarici, dal corpo luteo, dalla placenta nelle femmine (De Jong, 1990) e, nel maschio, dalle cellule del Sertoli e/o di Leydig, a seconda della specie (Majdic *et al.*, 1997; Kommos *et al.*, 2000; Taniyama *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008) .

All'interno del testicolo, l'inibina è coinvolta nella regolazione della spermatogenesi ed anche nella steroidogenesi (Kommos *et al.*, 2000).

L'immunoreattività alla subunità  $\alpha$  è stata evidenziata molto precocemente nello sviluppo del testicolo, in stretta correlazione con la formazione dei tubuli seminiferi ed è espressa sia nelle cellule di Leydig sia nelle cellule del Sertoli (Rabinovici *et al.*, 1991; Eramaa *et al.*, 1992; Majdic *et al.*, 1997; Roberts, 1997; Wallace *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2002).

Nell'uomo l'inibina  $\alpha$  rimane espressa nelle cellule del Sertoli anche nell'età adulta (Garde *et al.*, 1989; Vliegen *et al.*, 1993; Kommos *et al.*, 2000) e per questo motivo è un'importante marker diagnostico. Nel cane, l'espressione di inibina  $\alpha$  nelle cellule del Sertoli immature non è mai stata testata, mentre nelle stesse cellule del cane adulto tale espressione risulta alquanto controversa. Infatti mentre in alcuni studi è stata

osservata (Garde *et al.*, 1989) altri Autori non ne hanno trovato traccia (Taniyama *et al.*, 2001).

◆ **AMH (Anti-Müllerian Hormone):**

appartenente alla famiglia dei “Transforming Growth Factor- $\beta$ ” (TGF $\beta$ ), glicoproteine coinvolte nella regolazione della crescita e differenziazione dei tessuti, l’AMH è responsabile della regressione dei dotti di Müller nel feto maschio (Jost, 1947; Rey, 1998) esercitata attraverso un meccanismo di apoptosi (Taguchi *et al.*, 1984; Josso *et al.*, 2006).

L’Anti-Müllerian Hormone è una delle prime proteine specifiche delle cellule del Sertoli espressa dalla gonade maschile ed è prodotta principalmente dalle cellule del Sertoli immature (Tran *et al.*, 1977).

Numerosi studi, condotti su diverse specie, hanno indagato le tempistiche di comparsa e attività dell’ AMH, correlate a quelle del relativo sviluppo embrionale.

Sorprendentemente, i risultati hanno confermato che l’AMH non è secreto solo in età embrionale, ma persiste anche dopo la nascita, a seconda della specie, per tempi diversi, per poi decrescere lentamente e scomparire in età adulta.

La maggior parte degli studi sono stati condotti sull’uomo, specie per la quale si hanno le informazioni più accurate e, soprattutto, per la quale sono ben note le fasi di sviluppo sessuale. Per le altre specie, spesso caratterizzate da uno sviluppo sessuale estremamente rapido e studiate per comparazione con l’uomo, vengono riportati dati più approssimativi.

Nell’ uomo la produzione di AMH è attestata fin dal 51esimo giorno di gestazione, mentre l’attiva regressione dei dotti del Müller non sarà completa prima del 64esimo giorno di gestazione (O’Rahilly, 1973; Josso *et al.*, 1977; Taguchi *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1993; Rey *et al.*, 1996). Nel neonato, le cellule del Sertoli continuano a produrre grandi quantità di AMH, registrando la massima concentrazione nei primi cinque mesi di vita (Donahoe *et al.*, 1992). In seguito, essa subisce un lento e costante declino, pur essendo ancora sorprendentemente alta a dodici mesi di vita. La sua espressione è presente fino alla pubertà (Josso *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996). Durante la maturazione puberale, le concentrazioni sieriche di AMH decrescono lentamente in concomitanza allo sviluppo sessuale (Baker *et al.*, 1993; Rey *et al.*, 1993) con l’aumento della produzione di androgeni da parte delle cellule di Leydig e soprattutto dell’inizio della meiosi delle cellule germinali (Rey, 2005). Nell’adulto, infine, i livelli sierici di AMH sono molto bassi o addirittura assenti (Rey *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1996).

Nel dettaglio, le tempistiche di espressione ed azione dell'AMH, nelle diverse specie, sono di seguito riportate:

- nel RATTO compare già al 13esimo giorno post coitum (g.p.c), mentre la completa regressione dei dotti di Müller si registra al 17esimo g.p.c. (Lee *et al.*, 1993). Inoltre si riscontra la presenza di AMH fino alle tre settimane di vita post-natale (Donahoe *et al.*, 1977);
- nel TOPO la produzione di AMH inizia a partire dall'11esimo-12esimo g.p.c (Hacker *et al.*, 1995; Rey *et al.*, 1996; Al Attar *et al.*, 1997) e si mantiene fino al 15esimo giorno di vita (Al Attar *et al.*, 1997);
- nel VITELLO la produzione di AMH, iniziata a 42-43 g.p.c, è alta per tutta la vita fetale e tale si mantiene fino a 50-80 giorni di vita (Vigier *et al.*, 1984). Anche in successivi studi è stato confermato che l'AMH permane fino a 6-8 settimane di età, è difficilmente riscontrabile a 10 settimane e a 12 settimane è totalmente assente (Donahoe *et al.* 1977; Meyers-Wallen *et al.* 1989; Meyers-Wallen *et al.* 1993);
- nel CAVALLO l'unico dato presente in letteratura conferma il rilevamento di AMH in testicoli fetali, neonatali e fino all'inizio della pubertà. Nei testicoli adulti normali, l'AMH non è espresso, mentre nei testicoli criptorchidi si rileva fino a tre-quattro anni di età (Ball *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il CANE: gli studi più approfonditi sono stati condotti negli anni 90 da Meyers-Wallen e collaboratori che indagarono le tempistiche dell'espressione dell'AMH in relazione all'organogenesi del cane. La secrezione dell'AMH è rilevabile al 36esimo giorno di gravidanza, contemporaneamente alla progressiva regressione dei dotti paramesonefrici, che si conclude entro i 46 giorni (Meyers-Wallen *et al.*, 1987; Meyers-Wallen *et al.*, 1991). I dati inerenti l'espressione di AMH nel cucciolo neonato sono frammentarii (Jost *et al.*, 1965; Meyers-Wallen *et al.*, 1987; Meyers-Wallen *et al.*, 1989; Meyers-Wallen *et al.* 1991). Un solo articolo (Meyers-Wallen *et al.*, 1987) riporta che in un soggetto di 143 giorni i testicoli sono ancora positivi. Non sono presenti studi che indagano la reattività testicolare in soggetti di età superiore.

## **SCOPO DEL LAVORO**

E' noto, da lavori svolti sull'uomo e sul topo, che la maturazione delle cellule del Sertoli è accompagnata da una serie di modificazioni morfofunzionali, cui fanno riscontro mutamenti nell'espressione immunostochimica di alcuni markers. Infatti, via via che si procede dalla vita fetale all'età neonatale e poi a quella adulta, alcuni markers vengono mantenuti, altri scompaiono ed altri ancora vengono acquisiti.

I risultati degli studi morfologici ed immunostochimici condotti in medicina umana hanno permesso, nell'uomo ed in alcune specie di animali da laboratorio, di risalire alla sequenza temporale della comparsa dei markers tipici della cellula del Sertoli, caratterizzando, in questo modo, una delle cellule più dinamiche del parenchima testicolare.

Nella specie canina, tali informazioni sono scarse e frammentarie, ma quanto mai utili per capire il meccanismo che sta alla base dell' eventuale riespressione di marker fetali, neonatali o prepuberali nei disturbi del testicolo adulto (Franke *et al.*, 2004).

Lo scopo di questo lavoro, quindi, è stata la caratterizzazione immunofenotipica della normale cellula del Sertoli canina, dalla gonade fetale a quella adulta, nel tentativo di poter delineare, per questo tipo cellulare, una sorta di linea temporale di espressione di markers immunostochimici, utile in un secondo momento, per poter fare chiarezza su quali e quanti markers, in corso di trasformazione neoplastica, la cellula del Sertoli canina mantenga, perda o re-acquisiti.

## MATERIALI E METODI

In collaborazione con la Divisione di Ostetricia e Ginecologia del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della facoltà di Milano e grazie al contributo di alcuni liberi professionisti, sono stati fatti pervenire alla Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare di questa Facoltà, 34 paia di testicoli appartenenti a cani di diversa età, fissati in formalina tamponata al 10%.

I testicoli, appartenevano, rispettivamente, a:

- 2 feti (40 giorni di gestazione) ottenuti tramite taglio cesareo per interruzione di gravidanza richiesta dal proprietario;
- 15 cuccioli neonati, morti durante il travaglio dopo una regolare gravidanza o deceduti tra il primo ed il ventesimo giorno di vita;
- 5 cuccioli impuberi (da 43 giorni di vita a 6 mesi di età);
- 14 cani adulti (da 10 mesi a 84 mesi di età).

Tutti i campioni considerati non presentavano alcuna lesione macroscopica.

I tessuti sono stati inclusi in paraffina dopo processazione in scala crescente di alcoli e chiarificazione in xilene. Da ciascun blocchetto così ottenuto sono state prodotte sezioni seriate di 5 micron di spessore. Una di tali sezioni è stata colorata con Ematossilina-Eosina ed è stata destinata all'esame istologico; le altre sezioni sono state invece destinate all'esame immunohistochimico. Tale esame è stato svolto tramite il metodo ABC (Hsu *et al.*, 1981), avvalendosi di 5 diversi anticorpi primari i cui dati riferibili a diluizioni, tecniche di smascheramento antigenico e casa produttrici sono riportati in tabella 1.

Con l'esame istologico si è provveduto ad una descrizione morfologica delle gonadi, mentre, per quanto riguarda l'immunohistochimica, una volta colorati, i vetrini sono stati osservati al microscopio e, per ciascun marker, si è operata una valutazione semiquantitativa delle cellule positive secondo un sistema di + così conformato:

- + meno del 5% di cellule positive;
- ++ da 6-30% di cellule positive;
- +++ da 31-70% di cellule positive;
- ++++ da 71-100% di cellule positive.

**Tab.1. Immunoistochimica: anticorpi impiegati**

<b>ANTICORPO</b>	<b>CLONE</b>	<b>AZIENDA PRODUTTRICE</b>	<b>DILUIZIONE</b>	<b>SMASCHERAMENTO</b>
CKAE1/AE3	AE1/AE3	Zymed	1:3000	Pepsina 37°, 15 min
VIM	VIM3B4	Dako-cytomation	1:1000	-
DESMINA	NCL-L- DES-DERII	Novocastra Laboratories Ltd	1:300	Pepsina 37°, 15 min
INIBINA $\alpha$	MCA951S	Serotec	1:40	Termoindotto, microwave 650W, 10 min
ANTI MULLERIAN HORMONE	Sc 6886	Santa Cruz Biotechnology	1:30000	Termoindotto, bagnomaria 95°, 5 min

## **RISULTATI**

Nell'ambito di questo capitolo verranno in primo luogo esposti i risultati relativi agli esami istologici e poi quelli relativi agli esami immunohistochimici. I risultati dell'esame immunohistochimico sono poi schematizzati nelle tabelle 2 e 3 poste alla fine di questo capitolo accanto al materiale iconografico.

### **Esame istologico**

#### **FETI E NEONATI**

Le coppie di testicoli dei 2 feti e dei 15 cuccioli neonati erano caratterizzate dalla presenza di strutture tubulari di piccole dimensioni, circondate da abbondante tessuto interstiziale densamente cellulare, nell'ambito del quale erano a volte chiaramente distinguibili le cellule di Leydig e la rete testis. I tubuli, di forma ellittica, non presentavano lume ed erano rivestiti da cellule del Sertoli disposte a palizzata e strettamente affrontate con quelle situate al lato opposto del tubulo (Fig.1). Tali cellule erano caratterizzate da nuclei ovoidali ipercromatici in posizione basale e scarsa quantità di citoplasma. All'interno dei tubuli, per lo più al centro e meno frequentemente lungo la membrana basale, erano inoltre evidenti un numero limitato di cellule seminali ancora indifferenziate (spermatogoni) dotate di nucleo rotondo, ipocromatico, e nucleolo grande e ben evidente.

#### **IMPUBERI**

Nei cuccioli di 43 e 45 giorni i tubuli seminiferi erano di piccole dimensioni, circondati da abbondante tessuto interstiziale densamente cellulare, nell'ambito del quale erano spesso chiaramente distinguibili le cellule di Leydig e la rete testis. I tubuli, di forma ellittica, non presentavano lume ed erano rivestiti da cellule del Sertoli disposte a palizzata e strettamente affrontate con quelle situate al lato opposto del tubulo (Fig.2). Tali cellule erano caratterizzate da nuclei ovoidali ipercromatici in posizione basale e scarsa quantità di citoplasma. All'interno dei tubuli, per lo più al centro e meno frequentemente lungo la membrana basale, erano inoltre evidenti un numero limitato di cellule seminali ancora indifferenziate dotate di nucleo rotondo, ipocromatico, e nucleolo grande e ben evidente (spermatogoni).

Le coppie di testicoli appartenenti ai cuccioli di età superiore, 4 e 6 mesi rispettivamente, mostravano tubuli seminiferi di dimensioni pari a quelli degli adulti, separati da moderata quantità di interstizio e dotati di lume evidente. All'interno dei

tubuli erano riconoscibili le cellule del Sertoli frammiste a cellule della linea germinale che non superavano lo stadio maturativo di spermatocita.

#### **ADULTI**

Nei testicoli esaminati non si osservavano lesioni. Il parenchima testicolare era ben conformato e composto da tubuli rivestiti da cellule del Sertoli contenenti tutti gli stadi di differenziazione della linea seminale fino agli spermatozoi (Fig.3), presenti in quantità anche nell'epididimo. Nell'interstizio testicolare erano ben riconoscibili le cellule di Leydig.

#### **Esame immunostochimico**

Tutti i testicoli considerati hanno evidenziato una buona reattività immunostochimica a tutti gli anticorpi impiegati. Questo veniva verificato dalla buona positività mostrata dalle strutture anatomiche presenti nel testicolo e considerate come controlli interni. Questi erano rappresentati per la vimentina dallo stroma interstiziale; per le citocheratine dalle cellule epiteliali dei tubuli della *rete testis* e dell'epididimo; per l'inibina- $\alpha$  dalle cellule di Leydig; per la desmina dalle cellule muscolari delle pareti vascolari.

#### **FETI E NEONATI**

##### ***Vimentina***

In tutti i soggetti lo stroma risultava fortemente positivo.

In 5 paia di testicoli neonati su 17, le cellule del Sertoli esprimevano tale marker (Fig.4). Il numero di cellule marcate variava da meno del 5% in 2 soggetti, dal 6-30% in un unico soggetto, dal 31-70% in 2 soggetti (Tab.2).

##### ***CKAE1/AE3***

In tutti i campioni considerati le cellule del Sertoli erano totalmente negative, mentre i tubuli della rete testis e l'epididimo risultavano sempre marcatamente reattivi.

##### ***INH- $\alpha$***

In 15/17 paia di testicoli le cellule del Sertoli esprimevano tale marker (Fig. 5). Il numero di cellule marcate era inferiore al 5% in 4 soggetti, variava dal 31-70% in altrettanti soggetti e dal 71-100% in 7 soggetti.

Per quanto riguarda le cellule di Leydig, queste erano positive in 15/17 paia di testicoli, ed il numero di cellule marcate variava da meno del 5% al 71-100%.

In 13/17 individui l' INH $\alpha$  era espressa sia dalle cellule del Sertoli che da quelle di Leydig. In 2 individui (caso 3 e 12), le cellule del Sertoli erano positive a fronte di una completa negatività delle cellule di Leydig, ed in altrettanti soggetti (caso 5 e 16) si assisteva alla positività delle cellule di Leydig e alla negatività di quelle del Sertoli.

### ***Desmina***

In tutti i campioni considerati le cellule del Sertoli erano totalmente negative, mentre si registrava una costante positività da parte delle cellule stromali mioidi peritubulari.

### ***AMH***

In tutti i soggetti il citoplasma delle cellule del Sertoli risultava fortemente positivo per AMH (Fig. 6, Tab.2). Il numero di cellule marcate era sempre molto alto, praticamente pari al 100% delle cellule considerate. Le cellule di Leydig e gli spermatogoni erano sempre negativi.

### **IMPUBERI**

***Vimentina:*** in tutti i campioni considerati, erano sempre positive le cellule dello stroma interstiziale testicolare ed epididimale, nonché l'albuginea e le strutture vascolari.

Nei soggetti più giovani (43-45 giorni) il numero delle cellule del Sertoli positive per vimentina era limitato (meno del 5 %), mentre nei soggetti di età superiore, il numero di cellule marcate aumentava sensibilmente (dal 31% al 100%) (Tab.3).

***INH- $\alpha$ :*** non era mai presente nelle cellule del Sertoli, mentre era sempre espressa dalle cellule di Leydig, sebbene con diversa intensità (da meno del 5% al 70%).

***CKAE1/AE3:*** le cellule del Sertoli risultavano costantemente negative, mentre le cellule epiteliali della *rete testis* e da quelle dell'epididimo erano sempre positive.

***Desmina:*** le cellule del Sertoli risultavano costantemente negative per questo marker, mentre le cellule dello stroma interstiziale e la parete muscolare dei vasi risultavano positivi. In tutti i soggetti, le cellule stromali mioidi peritubulari erano positive.

**AMH:** nei soggetti di 43 e 45 giorni marcava diffusamente (dal 71-100%) il citoplasma delle cellule del Sertoli presenti. Le cellule di Leydig e gli spermatogoni erano, al contrario, sempre negativi.

Nei soggetti di 4 e 6 mesi di età, L'AMH non era mai espresso dalle cellule del Sertoli presenti nelle sezioni, né dalle cellule di Leydig né dagli spermatociti (Tab.3).

#### **TESTICOLI MATURI**

**Vimentina:** le cellule del Sertoli presenti nelle sezioni erano diffusamente positive (71-100%) per questo marker, che inoltre, marcava le cellule dello stroma interstiziale testicolare ed epididimale, nonché l'albuginea e le strutture vascolari (Fig.7).

**INH- $\alpha$ :** non era mai espressa dalle cellule del Sertoli, mentre era sempre positiva nelle cellule di Leydig, sebbene con diversa intensità.

**CKAE1/AE3:** non erano mai espresse dalle cellule del Sertoli, ma costantemente positive nelle cellule epiteliali della *rete testis* e da nell'epididimo.

**Desmina:** non era mai presente nelle cellule del Sertoli, ma era ben riconoscibile in alcune cellule dello stroma interstiziale e a livello della parete muscolare dei vasi. In tutti i soggetti, le cellule stromali mioidi peritubulari erano positive.

**AMH:** non era mai espresso dalle cellule del Sertoli presenti nelle sezioni, né dalle cellule di Leydig né dagli spermatociti (Tab.3).

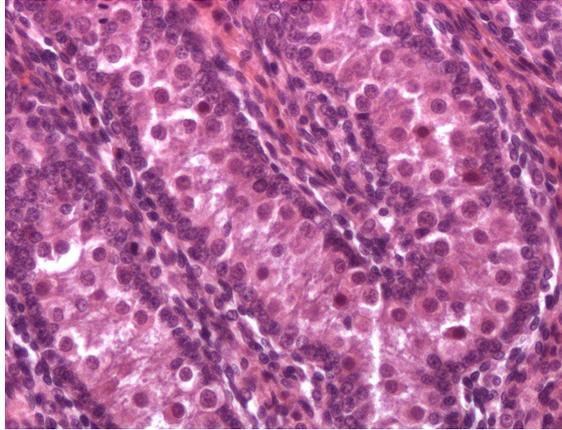
**Tab.2. Immunoistochimica: feti e neonati**

CASO N°	PROT	N°	RAZZA	ETÀ (GIORNI)	INHα LEYDIG CELLS	INHα SERTOLI CELLS	VIM	CK	DES	AMH
1	1082/09 B		Incrocio	Feto 40 g	+	++++	+++	-	-	++++
2	1140/09		Incrocio	Feto 40 g	++	++++	-	-	-	++++
3	1320/08		Boxer	0* g	-	+++	-	-	-	++++
4	57/09		Maltese	0 g	+++	++++	-	-	-	++++
5	1117/09		Boxer	0 g	+	-	+++	-	-	++++
6	1116/09		WHWT	0 g	++++	++++	++	-	-	++++
7	541/10		Golden Retriever	0 g	+	++++	-	-	-	++++
8	594/10		Bassotto	0 g	+	++++	-	-	-	++++
9	378/09		Chihuahua	1 g	++	+++	-	-	-	++++
10	303/10		Barboncino nano	2 g	+	+	-	-	-	++++
11	58/09		Cane nudo messicano	3 g	++	+++	-	-	-	++++
12	408/09 #2		Incrocio	3 g	-	++++	-	-	-	++++
13	408/09 #3		Incrocio	4 g	+++	+++	-	-	-	++++
14	PN61/10 A		CKCS	7 g	+++	+	+	-	-	++++
15	PN61/10 C		CKCS	7 g	+++	+	-	-	-	++++
16	345/09		Segugio	14 g	+	-	-	-	-	++++
17	137/09		Cane nudo messicano	20 g	++	+	+	-	-	++++

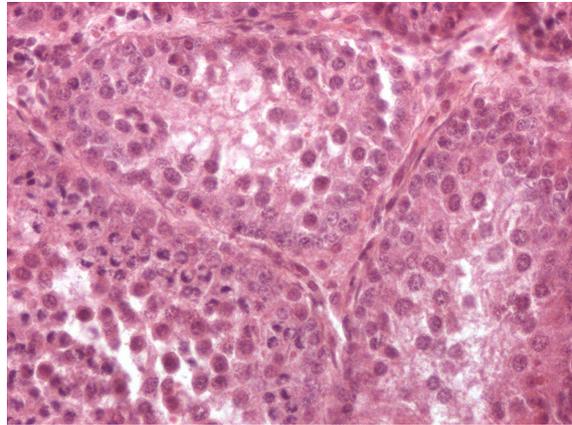
CKCS= Cavalier King Charles Spaniel; WHWT= West Highland White Terrier.

**Tab.3. Immunoistochimica: cuccioli (16-20) ed adulti (19-34)**

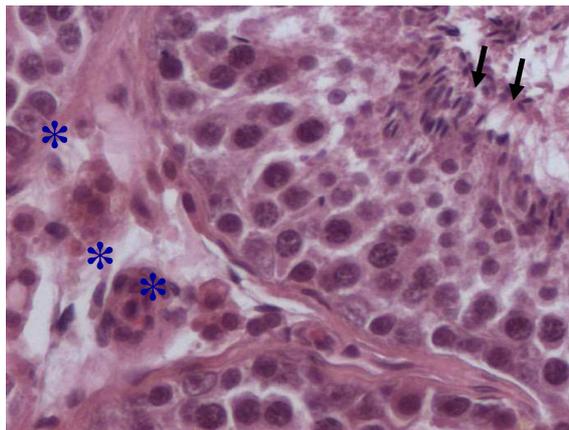
CASO N°	PROT N°	RAZZA	ETÀ (GIORNI/MESI)	INH $\alpha$ LEYDIG CELLS	INH $\alpha$ SERTOLI CELLS	VIM	CK	DES	AMH
16	PN43/95	Bull Mastiff	43 g	+	-	+	-	-	++++
17	488/10A	Chihuahua	45 g	+	-	+	-	-	++++
18	488/10B	Chihuahua	45 g	+	-	++	-	-	++++
19	PN240/09	Bulldog inglese	4 m	+++	-	+++	-	-	-
20	PN130/09	American St. Terrier	6 m	++	-	++++	-	-	-
21	B39	Pastore tedesco	10 m	+	-	++++	-	-	-
22	A12	Incrocio	12 m	+	-	++++	-	-	-
23	A10	Barboncino nano	12 m	+	-	++++	-	-	-
24	A15	Bassotto	12 m	++	-	++++	-	-	-
25	A6	Pinscher	12 m	+	-	++++	-	-	-
26	A9	Incrocio	15 m	++	-	++++	-	-	-
27	A7	Bulldog inglese	15 m	++	-	++++	-	-	-
28	B38	Pastore bergamasco	15 m	++	-	++++	-	-	-
29	A8	Pastore tedesco	16 m	+	-	++++	-	-	-
30	A3	Golden Retriever	24 m	+	-	++++	-	-	-
31	B37	Chihuahua	24 m	++	-	++++	-	-	-
32	A11	Pinscher	36 m	+	-	++++	-	-	-
33	A4	Incrocio	60 m	+	-	++++	-	-	-
34	B9	Shih-Tzu	84 m	+	-	++++	-	-	-



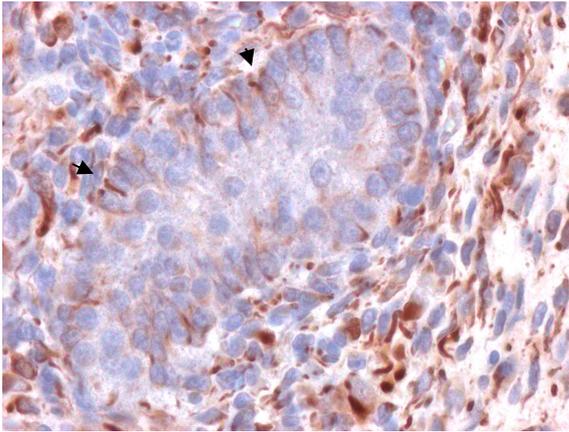
**Fig.1.** Testicolo di cane neonato. Si noti l'assenza di lume tubulare e le cellule del Sertoli strettamente affrontate le une alle altre. EE, 200x.



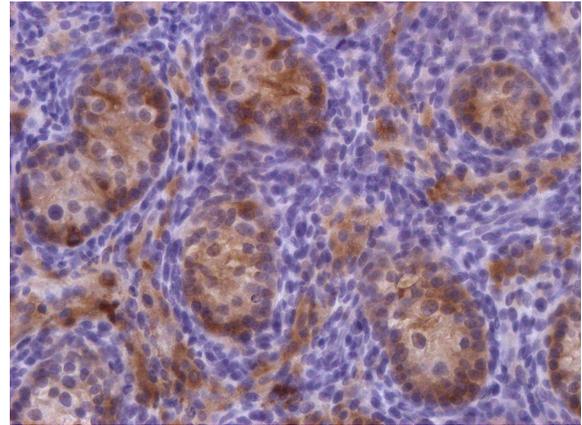
**Fig. 2.** Testicolo di cucciolo di 6 mesi. I tubuli seminiferi risultano ben conformati ma la linea germinale è ancora incompleta. EE, 200x.



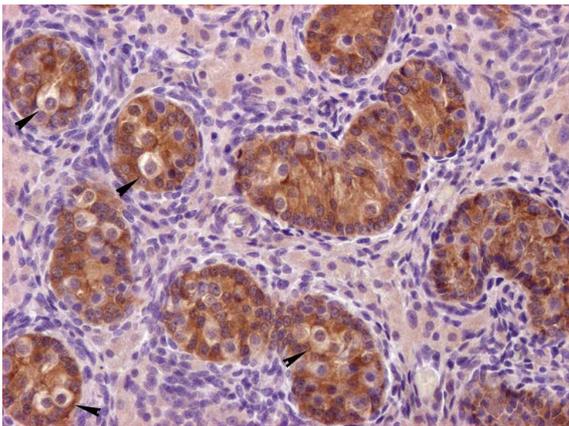
**Fig. 3** Testicolo di cane adulto. A destra: porzione di tubulo seminifero con linea seminale completa. Le frecce indicano gli spermatozoi. Nell'interstizio sono evidenti gruppi di cellule di Leydig (asterischi). EE, 200x.



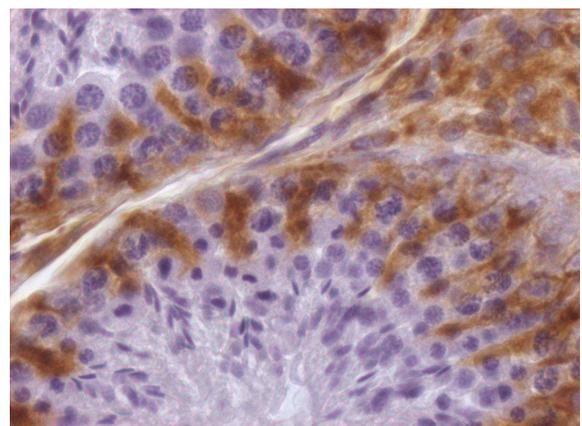
**Fig. 4.** Testicolo di cane neonato. Immunoistochimica per vimentina. Sia lo stroma che le cellule del Sertoli (frecce) sono positive. 400x.



**Fig. 5.** Testicolo di cane neonato. Immunoistochimica per INH- $\alpha$ . Sia le cellule del Sertoli che le cellule di Leydig sono diffusamente positive. 200x.



**Fig. 6.** Testicolo di cane neonato. Immunoistochimica per AMH. Le cellule del Sertoli sono diffusamente positive, mentre le cellule di Leydig e gli spermatogoni (frecce) sono costantemente negative. 200x.



**Fig. 7.** Testicolo di cane adulto. Immunoistochimica per vimentina. Si notino le cellule del Sertoli e le cellule di Leydig marcatamente positive. 400x.

## DISCUSSIONE

In medicina è noto, da lavori svolti sull'uomo e sul topo, che la maturazione delle cellule del Sertoli è accompagnata da numerose modificazioni morfofunzionali e altrettanti mutamenti nell'espressione di markers cellulari. Alcuni markers strutturali sono sempre mantenuti, altri sono espressi solo in maniera transitoria, per poi scomparire con la maturazione cellulare o riapparire in condizioni patologiche.

Data la completa assenza, in medicina veterinaria, di informazioni concernenti l'immunofenotipo della cellula del Sertoli canina nel corso dello sviluppo e maturazione fisiologica del testicolo, il presente studio ha avuto l'obiettivo di stabilire la sequenza temporale della comparsa di *markers* cellulari propri di questa cellula, dalle ultime fasi di gestazione fino alla maturità sessuale. I dati ottenuti in questa prima fase di indagine, focalizzata esclusivamente su tessuti normali e sulle modificazioni straordinarie che la cellula del Sertoli attraversa unitamente allo sviluppo del parenchima testicolare e all'inizio della spermatogenesi, saranno utili in una seconda fase di lavoro, nella quale si confronterà l'immunofenotipo della cellula del Sertoli normale con quello della cellula del Sertoli neoplastica, per evidenziare quali e quanti markers cellulari, in corso di alterazioni patologiche, vengono mantenuti, persi oppure riacquisiti.

Pertanto si è proceduto con la raccolta di numerosi testicoli normali, appartenenti a cani di diversa età (2 feti, 15 neonati, 5 cuccioli impuberi, 14 soggetti adulti) che sono stati poi sottoposti ad esame istologico ed immunoistochimico.

Per risalire alla sequenza temporale della comparsa di *markers* cellulari propri della cellula del Sertoli canina, è stata indagata, sui campioni da noi selezionati, l'espressione immunoistochimica di vari markers strutturali (vimentina, pancitocheratine e desmina) e funzionali (inibina- $\alpha$  e Anti Müllerian Hormone).

Per quanto riguarda l'esame istologico, i testicoli di feti e neonati esaminati erano caratterizzati da una morfologia sovrapponibile. Infatti, indipendentemente dall'età dei vari soggetti, i tubuli seminali risultavano separati da abbondante tessuto interstiziale nel quale erano già ben visibili cellule di Leydig e la struttura della rete testis. I tubuli seminali erano invece assai piccoli, privi di lume e contenevano, inframmezzati alla cellule del Sertoli, solo alcune cellule seminali riferibili a spermatogoni. Le cellule del Sertoli, poi, erano di forma più allungata e più sottili rispetto a quelle adulte, in accordo con le descrizioni di testicoli immaturi presenti in letteratura e riguardanti il cane

(Kawakami *et al.*, 1991), il gatto (Sánchez *et al.*, 1993) l'uomo (Pelliniemi *et al.*, 1993) e animali da esperimento (Pelliniemi *et al.*, 1993).

Anche nei cuccioli impuberi, seppur appartenenti a razze ed età diverse, non si sono osservate grandi differenze, in quanto, in tutti i soggetti esaminati, si osservavano tubuli ben sviluppati, separati da una moderata quantità di interstizio, dotati di lume e di linea seminale, anche se non completa come nel caso dei soggetti adulti.

Le 14 paia di testicoli di cani adulti, infine, erano caratterizzate da tubuli seminali ben conformati, contenenti tutti gli stadi di differenziazione della linea seminale e separati da una esigua quantità di stroma.

Per quanto riguarda i risultati immunistochemici, è stato osservato come, nel corso della maturazione fisiologica della gonade maschile di cane, i markers strutturali e funzionali espressi dalle cellule del Sertoli cambino.

Per quanto riguarda la **vimentina**, questo marker risultava essere l'unico espresso costantemente dalle cellule del Sertoli dei soggetti impuberi ed adulti. I nostri risultati sono in linea con quanto osservato precedentemente nel cane in testicoli normali di controllo inclusi nei rari studi immunistochemici riguardanti il sertolioma (Patnaik and Mostofi, 1993; Peters *et al.*, 2001; Doxsee *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2009) e confermano che la vimentina è un marker d'elezione per le cellule del Sertoli, in accordo con quanto è stato osservato nell'uomo (Franke *et al.*, 1979; Aumüller *et al.*, 1988; Nielsen and Jacobsen, 1988; Bergmann and Kliesch, 1994; Rogatsch *et al.*, 1996; De Miguel *et al.*, 1997; Steger *et al.*, 1999; Brehm *et al.*, 2006) ed in altre specie (Van Vorstenbosch *et al.*, 1984).

Nei feti e nei neonati, invece, il quadro immunofenotipico era più complesso. La positività alla vimentina si osservava in soli 5 soggetti su 17 ed interessava un numero variabile di cellule. Questo dato non può essere comparato con altri riguardanti la specie canina, perché non presenti in letteratura. Esso appare tuttavia discordante con quanto osservato nell'uomo ed in alcuni animali da esperimento, ove l'espressione è presente fin dalla vita fetale (Bar-Shira Maymon *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2004; Brehm *et al.*, 2006; Franke *et al.*, 1979; Paranko *et al.*, 1986). Poiché l'espressione di vimentina era sempre presente negli adulti ed anche nei cuccioli impuberi, nei quali il numero delle cellule positive a questo marker pare aumentare via via con l'età del soggetto, si può ipotizzare che, nel cane, le cellule del Sertoli alla nascita non abbiano ancora un assetto morfofunzionale definito, e che l'acquisizione definitiva della vimentina, da parte di queste cellule, sia un fenomeno progressivo legato alla maturazione testicolare.

Per quanto concerne l'espressione di *inibina- $\alpha$* , nei testicoli normali di cane adulto e prepubere le cellule del Sertoli risultavano sempre negative, al contrario di quelle di Leydig ove l'INH- $\alpha$  era sempre espressa, sebbene con intensità variabile. La negatività all'INH- $\alpha$  da noi dimostrata, concorda con quanto riportato da Taniyama e collaboratori (2001). La negatività all'INH- $\alpha$  riscontrata nel cane contrasta però con i dati relativi all'uomo, dove si registra una costante positività delle cellule del Sertoli adulte.

La positività delle cellule del Sertoli all'INH- $\alpha$  è stata evidenziata, nei nostri casi, solo nei feti/neonati (per la precisione in 15/17 paia di testicoli), seppure in modo assai variabile. Il fatto che, tra un soggetto e l'altro, si sia evidenziata una grande differenza nel numero di cellule positive ad INH- $\alpha$  potrebbe essere dovuto a caratteristiche individuali e/o legate alla razza e alla dimensione dei soggetti in analisi. Per dimostrare tale ipotesi occorrerebbe raccogliere un maggiore numero di testicoli e clusterizzare i dati, oltre che per età, per razze e cucciolate.

Nei nostri campioni l'INH- $\alpha$  è stata evidenziata solo nei neonati e non nel testicolo adulto e inoltre, sembra che la sua espressione decresca durante il fisiologico processo maturativo della gonade. A questo proposito va infatti osservata la differente e decrescente reattività dimostrata in due cuccioli fratelli, il primo morto a 3 giorni di vita ed il secondo a 20 (casi 11 e 17), ed il fatto che già a 43 giorni di vita, nel testicolo del cucciolo impubere più giovane incluso nella nostra casistica, non ci fossero più cellule del Sertoli positive per INH- $\alpha$ .

Queste osservazioni potrebbero suggerire che, nel cane, l'INH- $\alpha$  possa essere identificata come un marker di immaturità o di non completa differenziazione cellulare. Infine, per quanto riguarda la reattività delle cellule di Leydig, queste risultano quasi sempre positive per INH- $\alpha$  (34/34 casi esaminati), indipendentemente dall'età dei soggetti. Una diminuzione del numero di cellule positive è stata osservata nei soggetti prepuberali/adulti rispetto ai feti/neonati. Il fatto che, con l'età, diminuisca il numero di cellule di Leydig positive, è stato già descritto da diversi autori in altre specie (Koike e Noumura, 1993; Majdic *et al.*, 1997; Weng *et al.*, 2005), così come sono state dimostrate differenze specie-specifiche, a livello testicolare, nella cellula principalmente adibita alla produzione di INH- $\alpha$  (Jin *et al.*, 2001).

I nostri risultati dimostrano che, nel cane, a livello testicolare, il sito di produzione di INH- $\alpha$  cambia, durante la maturazione del soggetto, passando dalle cellule del Sertoli a quelle di Leydig, e confermano l'ipotesi di Taniyama e collaboratori (2001) che le cellule di Leydig rappresentino la fonte principale di INH- $\alpha$  nel cane adulto.

Per quanto concerne le **citocheratine** e la **desmina**, considerati in medicina umana markers di immaturità, espressi delle cellule del Sertoli solo in un breve periodo della vita fetale durante la differenziazione della gonade (Miettinen *et al.*, 1985; Stosiek *et al.*, 1990; Fröjdman *et al.*, 1992; Bergmann and Kliesch, 1994; Steger *et al.*, 1999; Pelliniemi and Fröjdman, 2001; Rogatsch *et al.*, 1996 ; De Miguel *et al.*, 1997), essi non sono da noi mai stati riscontrati nelle cellule del Sertoli canine, né degli adulti né dei neonati.

Va però ricordato che questi markers non sono mai stati indagati prima d'ora, in testicoli di cani neonati, e per quanto riguarda i feti, nella nostra casistica rientravano solo 2 soggetti, per altro a circa 2/3 della gestazione. Pertanto, per stimare l'effettiva reattività per desmina o citocheratine della gonade canina immatura, occorrerebbe aumentare i campioni a nostra disposizione e condurre approfonditi studi di embriologia, così come è stato fatto per le specie da laboratorio e per l'uomo.

Infine, per quanto concerne l'**AMH**, questo marker ha dimostrato una specifica ed esclusiva reattività a carico delle cellule del Sertoli canine immature. Più specificatamente, l'AMH veniva espresso in maniera costante e diffusa dalle cellule del Sertoli dei feti e neonati. Nei cuccioli impuberi, la positività all' AMH si riscontrava solo nei cuccioli più giovani (43-45 giorni), mentre i testicoli di cuccioli di 120-180 giorni di età, malgrado mostrassero innegabili caratteristiche istologiche di immaturità, risultavano negativi, come pure tutti i testicoli appartenenti a cani adulti. Pertanto, anche nel cane, è possibile affermare che l'AMH sia un marker di immaturità, che vede cessare la sua secrezione, nella specie canina, nei primi mesi dopo la nascita. Questo dato è in contrasto con quanto avviene nel cavallo, le cui cellule del Sertoli sono positive durante il primo anno di vita (Ball *et al.*, 2008), e nel bovino, ancora positivo ad un anno e mezzo di età (Vigier *et al.*, 1983).

Tale osservazione, nel complesso, non fa che confermare la specie-specificità nell'espressione temporale di AMH in accordo con quanto ipotizzato da Constantinople and Walsh (1973) e Donahoe *et al.* (1977 a, b).

Per concludere, il seguente lavoro ha dimostrato come anche la cellula del Sertoli canina, durante la sua maturazione, vada incontro a numerose modificazioni morfofunzionali e mutamenti nell'espressione di markers cellulari. Tali dati rappresentano le basi per studi successivi che analizzino l'espressione degli stessi markers nelle cellule del Sertoli non più in testicoli normali, ma bensì in condizioni patologiche quali, ad esempio, il Sertolioma.

## **CAPITOLO 2**

# **CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA DELLE CELLULE DEL SERTOLI NEOPLASTICHE NELLA SPECIE CANINA**

## INTRODUZIONE

### IL SERTOLIOMA CANINO

E' stato osservato che in molti casi le caratteristiche cellulari ed istologiche dei sertoliomi ricordano quelle delle cellule del Sertoli embrionali e fetali (Lawrence *et al.*, 1986).

Il Sertolioma è una neoplasia assai rara nell'uomo (Brehm *et al.*, 2006) ma frequente nel cane (De Jong *et al.*, 1990).

Il sertolioma canino, segnalato per la prima volta nel 1922 da Peyron, si riscontra più frequentemente nei soggetti adulti ed anziani, con un età media di circa 8 anni (Scully e Coffin, 1952; Cotchin, 1960) e nei soggetti criptorchidi (Reif, 1969), nei quali l'incidenza è 20 volte superiore rispetto ai cani con entrambi i testicoli in sede scrotale (Brodey e Martin, 1958; Kennedy *et al.*, 1998; Maclachland e Kennedy, 2002; Yu *et al.*, 2009).

Dal punto di vista morfologico, i sertoliomi sono distinti in due categorie: intratubulari e diffusi, mentre le forme intermedie vengono definite "da intratubulare a diffuso" (Kennedy *et al.*, 1998).

Il comportamento biologico del sertolioma è tendenzialmente benigno, anche se in letteratura non mancano segnalazioni di sertoliomi, per lo più diffusi, di grandi dimensioni, maligni e metastatizzanti (il 10-14% dei casi). Difficilmente, al contrario, tumori di piccole dimensioni (meno di 2 cm) o caratterizzati da crescita intratubulare danno origine a lesioni metastatizzanti (Dow, 1962; Maclachland e Kennedy, 2002).

Le metastasi si propagano per via linfatica (Weaver, 1983) o più raramente attraverso il funicolo spermatico (Laing *et al.*, 1983).

Nel cane, metastasi di sertolioma sono state segnalate nei linfonodi della regione pelvica e lombare, nel fegato, nel polmone, nel rene, nella milza, nel pancreas e nelle ghiandole surrenali (Coffin *et al.*, 1952; Brodey e Martin, 1958; Lipowitz, 1973). A tutt'oggi, in letteratura, è stato segnalato un singolo caso di metastatizzazione ossea (Goedegebuure, 1979).

Istologicamente le metastasi sono simili al tumore primario (Maclachland e Kennedy, 2002).

I sertoliomi si presentano come formazioni nodulari dure, bianche, multilobulate, ben demarcate, che si sostituiscono al normale parenchima testicolare, causando inoltre, una notevole compressione del tessuto circostante, rimanendo confinati all'interno

delle tunica albuginea. Nei tumori di dimensioni maggiori, spesso si assiste ad alterazione del profilo testicolare. I tumori maligni, invece, superano la tunica albuginea e si estendono alle strutture adiacenti, quali epididimo, vasi deferenti e cute dello scroto (Maclachland e Kennedy, 2002). La consistenza è dura a causa di dense bande di tessuto fibroso (desmoplasia) che si accompagnano alla proliferazione neoplastica. Spesso sono inoltre evidenti lesioni cistiche multifocali contenenti un liquido chiaro. Per quanto riguarda l'aspetto istologico, le differenze tra i due pattern di crescita sono minime, più nel dettaglio:

**-Sertolioma Intratubulare:** il tumore appare costituito da delicate cellule di forma triangolare allungata, dai bordi indistinti, disposte a palizzata perpendicolarmente alla membrana basale dei tubuli seminiferi neoformati. La membrana basale può essere spessa e consistente oppure può apparire sottoforma di setti sottili (Kennedy *et al.*, 1998). I nuclei sono ovoidali, vescicolosi e ipocromatici con piccoli nucleoli, le mitosi sono estremamente rare. A volte il citoplasma, debolmente eosinofilo e di aspetto omogeneo, può mostrare vacuoli lipidici che gli conferiscono aspetto schiumoso, e in tal caso il tumore viene definito "lipid rich".

**-Sertolioma Diffuso:** consiste in una distesa uniforme di cellule debolmente colorate, con mitosi infrequenti e priva di una qualsiasi organizzazione tubulare. La perdita del disegno tubulare si traduce in una notevole risposta fibrosa dello stroma, che spesso va incontro a ialinizzazione. Non è raro il reperimento di aree cistiche emorragiche o semplicemente contenenti del liquido (Kennedy *et al.*, 1998).

## IL SERTOLIOMA MALIGNO CANINO

E' stato osservato che i sertoliomi maligni metastatizzanti sono spesso caratterizzati dalla perdita del disegno tubulare e da un pattern di crescita infiltrativo diffuso (Scully e Coffin, 1952; Kennedy *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2001). Le cellule neoplastiche perdono le tipiche caratteristiche delle cellule del Sertoli e tendono ad assumere forma tonda o poligonale, con citoplasma eosinofilo e nuclei ampi, rotondi o ovali (Brodey e Martin, 1958).

Si possono osservare inoltre, nella compagine dello stesso tumore, cellule con nuclei piccoli e citoplasma pallido, irregolare e merlettato, frammiste a cellule con nucleo più grande e ipercromatico e citoplasma contenente pochi vacuoli, nonché forme intermedie fra i due tipi cellulari (Coffin *et al.*, 1952).

All'interno delle masse neoplastiche spesso si osservano ampie zone contenenti tessuto necrotico e sangue, inframmezzate ad aree di tessuto connettivo mixomatoso, in cui si possono rilevare masse irregolari di cellule neoplastiche di grandezza variabile e di forma bizzarra, caratterizzate da nuclei grandi nonché da numerosi vacuoli intracitoplasmatici, otticamente vuoti (Coffin *et al.*, 1952 ).

La forma maligna del sertolioma è più frequentemente associata, pur nella rarità dei casi, a testicoli criptorchidi, che possono anche presentare un certo grado di torsione sul proprio funicolo. Il testicolo scrotale, quando presente, presenterà i classici segni di atrofia da inibizione da estrogeni come accade nelle neoplasie che sorgono su testicoli correttamente discesi (Davidson *et al.*,2006).

## **PATOLOGIA COMPARATA: IL SERTOLIOMA DELL'UOMO**

Il sertolioma nell'uomo è meno frequente che nel cane.

La sua incidenza rientra in un *range* compreso tra lo 0,4% e l' 1,5 % di tutte le neoplasie testicolari (Kolon e Hochman, 1997; Adayener *et al.*, 2008) ed è pertanto considerato un tumore raro, frequentemente associato con lo pseudoermafroditismo e altre *intersex syndromes* (Pick, 1905; Kruckmann, 1937; Witschi e Mengert, 1942; Mostofi, 1973; Brehm *et al.*, 2006).

Il sertolioma è stato segnalato in tutte le fasce di età, compresi i neonati (Steele e Richie, 1997), ed ha un comportamento generalmente benigno.

All'esame microscopico il tessuto neoplastico risulta composto da formazioni solide strettamente collegate tra costituite da tubuli dotati di lume, molto simili ai tubuli seminiferi del testicolo prepuberale (Collins e Symington, 1964; Talerman e Roth, 1986). Spesso le cellule sono di forma colonnare e presentano un citoplasma leggermente eosinofilo con occasionali vacuoli. I nuclei sono moderatamente pleomorfi, ipercromatici, con prominenti nucleoli e le mitosi sono numerose.

## **IL SERTOLIOMA MALIGNO DELL'UOMO**

Le forme maligne sono inusuali, metastatizzanti, con meno di 30 casi descritti dalla letteratura mondiale (Kolon e Hochman, 1997). La frequenza del sertolioma maligno metastatizzante è stimata attorno al 10% (Mostofi e Davis, 1985; Steele e Richie, 1997; Adayener *et al.*, 2008). I siti di metastasi più frequenti risultano essere i linfonodi iliaci e para-aortici, seguiti da fegato, polmoni e pleura, cervello e scheletro e linfonodi inguinali, retroperitoneali, mediastinici e subclavicolarari (Nielsen e Jacobsen, 1988; Lindegaard Madsen e Mørck Hultberg, 1990). La via di metastatizzazione è primariamente quella linfatica, seguita da quella ematogena (Talerman, 1971).

L'età media dei pazienti è di circa 40 anni (Kolon e Hochman, 1997). In accordo con la letteratura, l'età è considerata un fattore importante nell'insorgenza di metastasi, poiché il rischio di una disseminazione del tumore primario sembra essere maggiore in pazienti anziani (Nogales *et al.*, 1995; Ustun *et al.*, 1996; Bufo *et al.*, 1999; Demir *et al.*, 2003; Adayener *et al.*, 2008). Nonostante ciò, sono stati segnalati casi di sertolioma maligno in bambini e adolescenti (Rosvoll e Woodard, 1968; Campbell e Middleton, 1980; Sharma *et al.*, 1990; Kolon e Hochman, 1997; Adayener *et al.*, 2008).

La differenziazione tra sertoliomi maligni e benigni dal punto di vista istologico è spesso difficoltosa. Talvolta le forme sdifferenziate vengono erroneamente diagnosticate come seminomi (Adayener *et al.*, 2008), e non esistono pattern

istopatologici correlati con certezza al comportamento biologico del tumore (Featherstone *et al.*, 2009). Tuttavia le forme maligne sono per lo più caratterizzate da una crescita solida di tipo laminare, con tubuli rari e scarsamente formati (Nielsen e Jacobsen, 1988; Kronz *et al.*, 1998). Le caratteristiche associate a malignità sono l'atipia cellulare, l'elevato indice mitotico, la necrosi, l'invasione vascolare e linfatica, la scarsa demarcazione del tumore rispetto al parenchima normale, la crescita extratesticolare, le grosse dimensioni della neoplasia e la scarsa risposta alla chemioterapia ed alla radioterapia (Talerman, 1971; Nielsen e Jacobsen, 1988; Nogales *et al.*, 1995; Kolon e Hochman, 1997; Kronz *et al.*, 1998; De Raeve *et al.*, 2003; Steele e Richie, 2007; Adayener *et al.*, 2008).

In letteratura, tuttavia, sono stati riportati casi metastatizzanti di neoplasie ben circoscritte, con indice mitotico basso (Kolon e Hochman, 1997; De Raeve *et al.*, 2003). Pertanto, i criteri di malignità sovracitati non possono essere utilizzati come modello prognostico universale e la presenza di metastasi rimane l'unico inequivocabile segno di malignità (Talerman, 1971; Nielsen e Jacobsen, 1988; Kronz *et al.*, 1998).

## **STUDI IMMUNOISTOCHEMICI**

Nonostante la rarità del sertolioma, nell'uomo sono stati effettuati diversi studi circa l'espressione di markers sia nelle cellule del Sertoli neoplastiche che in quelle normali. Nel cane, per contro, a dispetto della notevole frequenza di questi tumori, gli studi sono assai scarsi.

### **Immunoistochimica del sertolioma umano**

In numerosi studi viene descritta, nel citoplasma delle cellule neoplastiche, una diffusa colorazione immunoistochimica per vimentina (Nielsen e Jacobsen., 1988; O'Dowd *et al.*, 1990; Kratzer *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1998; Raeve *et al.*, 2003), mentre è stata osservata un'espressione variabile di citocheratine (soprattutto CK8/18 e AE1/AE3). Infatti, questo marker poteva essere presente, in maniera disomogenea spesso focale, all'interno delle cellule neoplastiche che rivestivano le formazioni tubulari della neoplasia, ed assente nelle aree a crescita solida (Talerman e Roth, 1986; Nielsen e Jacobsen, 1988; Henley *et al.*, 2002; Raeve *et al.*, 2003; Young, 2008). Inoltre va ricordato che nei sertoliomi, la positività per le citocheratine non è sempre riscontrata: in alcuni studi, infatti, i campioni analizzati si dimostravano negativi (Anderson, 1995; Raeve *et al.*, 2003). Va inoltre ricordato che la riespressione di questo marker, oltre che nei tumori, si presenta in diverse condizioni patologiche come ad esempio il criptorchidismo, l'atrofia testicolare, le cellule del Sertoli associate al carcinoma in situ e l'infertilità (Miettinen *et al.*, 1985; Nielsen e Jacobsen, 1988; Stosiek *et al.*, 1990; Bergmann e Kliesch, 1994; Steger *et al.*, 1996; De Miguel *et al.*, 1997; Kliesch *et al.*, 1998; Steger *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004). E' stata riportata, inoltre, la coespressione, da parte delle stesse cellule, di vimentina e citocheratina (Nielsen e Jacobsen., 1988).

In letteratura esistono pochi studi che impiegano l'AMH come marker immunoistochimico specifico per tumori con origine dalle cellule della granulosa o dalle cellule del Sertoli. In uno dei lavori più completi, nel quale veniva indagata la reattività dell'AMH su campioni riferibili a carcinomi ovarici ed uterini, a tumori della granulosa di origine ovarica ed extra-ovarica fino ai sertoliomi e gonadoblastomi, gli autori hanno dimostrato un pattern di espressione estremamente eterogeneo. Gli unici tumori positivi erano esclusivamente i tumori della granulosa, i gonadoblastomi ed i sertoliomi, anche se, in tutti questi ultimi, vi erano aree tumorali con cellule neoplastiche intensamente o debolmente positive frammiste a zone in cui si registrava totale

negatività. In particolare, in tutti i casi di sertolioma, le cellule neoplastiche positive si limitavano ad una esigua percentuale, riconducibile al 12% (Rey *et al.*, 2000).

Ciononostante, concludono gli autori, considerando la specificità di espressione dell'AMH, la presenza di poche cellule reattive è altamente suggestiva e diagnostica nell'identificare la cellula d'origine (cellule della granulosa e cellule del Sertoli) e a distinguerle da altre neoplasie primarie o metastatiche dell'apparato genitale.

L'inibina  $\alpha$  è considerata, in medicina umana, uno dei marker di elezione per le cellule del Sertoli, e la positività a questo marker è stata dimostrata nei sertoliomi, nei "Sertoli cell nodules" (spesso presenti in testicoli ritenuti, oppure nel testicolo controlaterale rispetto a quello affetto da seminoma), considerati precursori del sertolioma stesso, e nelle normali cellule di Leydig (McCluggage *et al.*, 1998; Kommoss *et al.*, 2000). I livelli di immunoreattività all'inibina  $\alpha$ , testati in diversi studi sui sertoliomi umani, si sono dimostrati molto variabili: in alcuni casi scarsi o addirittura non rilevabili (De Jong *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1998; Brehm *et al.*, 2006), in altri invece l'intensità della colorazione immunohistochimica si mostrava talora forte o talora moderata con una percentuale di cellule marcate variabile dal 30% al 90% (Iczkowski *et al.*, 1998; McCluggage *et al.*, 1998; Ulbright *et al.*, 2000; Raeve *et al.*, 2003; Compérat *et al.*, 2004; Young., 2008). Per giustificare una reattività così incostante, si è ipotizzato che l'espressione di inibina  $\alpha$  possa diminuire o addirittura essere assente in stadi tumorali avanzati, o che l'espressione di tale ormone possa accompagnarsi ad una aumentata proliferazione cellulare tale da determinare una pattern di crescita tumorale di tipo solido (Brehm *et al.*, 2006).

### **Immunoistochimica del sertolioma canino**

Come già accennato, i lavori effettuati su questo argomento sono molto scarsi e sono stati condotti su un numero limitato di casi, e pertanto richiedono ulteriori approfondimenti.

La maggioranza degli studi conferma, nel cane, una significativa reattività delle cellule neoplastiche per la vimentina (Patnaik e Mostofi, 1993; Peters *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2009; Doxsee *et al.*, 2006; Foster e Ladds, 2007).

Per quanto riguarda l'espressione di inibina- $\alpha$  (INH- $\alpha$ ), questa nel cane risulta alquanto controversa. In uno dei primi studi a tale proposito (Garde *et al.*, 1989), che vide l'impiego di un anticorpo anti-inibina umana ottenuto in coniglio e testato su campioni testicolari di uomo, scimmia e cane, si descrive una reattività costante a questo marker da parte delle cellule del Sertoli, delle cellule del Leydig, degli spermatogoni e degli spermatociti primari. Una reattività così ampia fa ipotizzare che tale anticorpo, in quegli anni alle sue prime fasi di impiego, non avesse ancora caratteristiche di specificità e sensibilità idonee.

Nei lavori più recenti, che utilizzano marker anticorpali più specifici viene riscontrata, da Tanyama e collaboratori (2001), una totale negatività all'INH- $\alpha$  da parte delle cellule del Sertoli canine, sia normali che neoplastiche, e un' esclusiva positività solo a carico delle cellule del Leydig (normali e neoplastiche). Altri autori, (Yu *et al.*, 2009), al contrario, segnalano un'elevata positività per INH- $\alpha$ , sia da parte delle cellule del Sertoli normali in testicoli adulti di controllo che nei tumori da essi derivati.

Per quanto concerne le citocheratine, l'unico lavoro nel quale vengono testate sul sertolioma canino ha dato esiti negativi, in quanto non è stata riscontrata alcuna positività (Patnaik e Mostofi, 1993).

Dati contrastanti riguardano invece l'espressione di desmina, in quanto Yu e collaboratori (2009) segnalano una positività di 5 sertoliomi su 15, mentre Patnaik e Mostofi (1993) registrano la completa negatività dei sertoliomi canini presi in considerazione.

I primi tentativi di indagare la secrezione di AMH da parte di testicoli neoplastici, con l'immunoistochimica, risalgono al 1977 (Donahoe *et al.*, 1977). In questi studi, i testicoli canini servivano più che altro come termine di paragone per l'indagine della reattività anticorpale su tessuti umani. I risultati di questo studio hanno dato esiti negativi per entrambe le specie.

In seguito, mentre nell'uomo è stato dimostrato come l'AMH sia un marker importante nella diagnostica dei sertoliomi, nel cane l'utilizzo di questo marker non ha più avuto

seguito, e pertanto, in letteratura, mancano dati riguardanti l'espressione di AMH nei sertoliomi canini.

### **SCOPO DEL LAVORO**

Data la mancanza di dati circa la caratterizzazione immunofenotipica del sertolioma canino, lo scopo di questo lavoro, è stato quello di utilizzare diversi markers, di comune impiego nella diagnostica anatomopatologica umana e veterinaria, al fine di risalire al profilo immunocistochimico di questo tipo di tumore.

## MATERIALI E METODI

Dall'archivio dei pezzi istologici della Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica di questa Facoltà, sono stati prelevati i blocchetti relativi a 21 tumori di cane diagnosticati come sertoliomi. I tumori appartenevano a cani di razze diverse e di età compresa tra 3 e 15 anni (età media 9 anni).

Tutti i campioni risalivano agli anni 1998-2008 ed erano pervenuti alla Sezione, fissati in formalina, tanto da ambulatori privati quanto dalle unità di Clinica della nostra Facoltà. Uno dei casi presi in considerazione era riferibile all'unico sertolioma maligno presente nei nostri archivi, appartenente ad un cane boxer criptorchide, che aveva sviluppato un sertolioma nel testicolo ritenuto in sede addominale ed era stato soppresso 2 anni dopo a causa di una metastasi addominale in sede pararenale verosimilmente a carico dei linfonodi lomboaortici.

I campioni sono stati processati secondo le tecniche di routine ed inclusi in paraffina. Dai blocchetti ottenuti sono state ottenute sezioni seriate di 4 micron di spessore, sottoposte a colorazione con **Ematossilina-Eosina** (EE) per:

- la valutazione istologica del pattern di crescita: intratubulare (I), diffuso (D) e "da intratubulare a diffuso" (I/D);
- la morfologia cellulare: a tale fine si è applicata la classificazione dei tumori testicolari umani così come esposta nel relativo volume edito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) (Mostofi e Sesterhenn, 1998).

Tale classificazione comprende il sertolioma di aspetto classico e due varianti rispettivamente definite "*lipid rich Sertoli cell tumor*" e "*large cell calcifying Sertoli cell tumor*". Non si è applicata l'analoga classificazione presente nei volumi editi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità riservati ai tumori animali, in quanto tali varianti non sono considerate.

- la valutazione dell'indice mitotico mediante la seguente formula: conta delle mitosi presenti in 10 campi a 400X fratto 10.

Infine, su tutti i campioni è stata effettuata la **colorazione immunoistochimica** con metodica ABC (Hsu *et al.*, 1981) impiegando gli anticorpi illustrati in Tabella 1.

**Tab 1. Immunoistochimica: anticorpi impiegati**

ANTICORPO	CLONE	AZIENDA PRODUTTRICE	DILUIZIONE	SMASCHERAMENTO
CKAE1/AE3	AE1/AE3	Zymed	1:3000	Pepsina 37°, 15 min
VIM	VIM3B4	Dako-cytomation	1:1000	-
DESMINA	NCL-L- DES-DERII	Novocastra Laboratories Ltd	1:300	Pepsina 37°, 15 min
INIBINA $\alpha$	MCA951S	Serotec	1:40	Termoddotto, microwave 650W, 10 min
ANTI MULLERIAN HORMONE	Sc 6886	Santa Cruz Biotechnology	1:30000	Termoddotto, bagnomaria 95°, 5 min

Per 16/21 tumori è stato possibile testare tutti i markers presi in considerazione. Per 5/21 casi, non è stato possibile testare i campioni per l'AMH, perché i blocchetti erano esauriti.

Una volta colorate le sezioni, i vetrini sono stati osservati al microscopio e, per ciascun marker, si è operata una valutazione semiquantitativa delle cellule positive secondo un sistema di "+" così conformato:

- + < 5% di cellule positive;
- ++ da 6-30% di cellule positive;
- +++ da 31-70% di cellule positive;
- ++++ da 71-100% di cellule positive.

## RISULTATI

Nell'ambito di questo capitolo verranno in primo luogo esposti i risultati relativi agli esami istologici e poi quelli relativi agli esami immunoistochimici. Tutti i risultati sono poi schematizzati in tabella 1, posta alla fine di questo capitolo accanto al materiale iconografico.

### **SERTOLIOMI: ESAME ISTOLOGICO ED ISTOCHIMICO**

#### ***Pattern di crescita***

Per quanto riguarda il pattern di crescita, 12 casi mostravano un aspetto strettamente intratubulare (57,14%), mentre 9/21 casi (42,85) mostravano focali aspetti di crescita diffusa, e sono pertanto stati classificati come "da intratubulare a diffuso".

#### ***Tipo morfologico***

##### **◆ Sertolioma classico**

In 13 casi su 21 (61,90%) il tumore mostrava le caratteristiche morfologiche di un classico sertolioma. Infatti, esso era composto da gruppi di strutture tubulari, dotate di una membrana basale evidente e frequentemente spessa, separati da setti stromali piuttosto consistenti. I tubuli neoplastici risultavano rivestiti da cellule allungate disposte a palizzata o talora formanti un tappeto solido, dotate di una moderata quantità di citoplasma debolmente eosinofilo. Il nucleo, di forma ovale, mostrava solo in rari casi un aspetto vescicoloso e raramente un nucleolo evidente (Fig. 1). In due casi è stata rilevata la presenza di strutture definite *Call-Exner bodies* (Fig.2).

Un unico caso (il sertolioma metastatizzante) era caratterizzato da una maggiore sdifferenziazione cellulare, tubuli d'aspetto cistico, circondati da pareti spesse e rivestiti da numerosi strati di cellule neoplastiche disposte in palizzata su più file (crescita solida) (Fig.3). Le cellule neoplastiche, mostravano nuclei di aspetto vescicoloso con cromatina a zolle e nucleoli spesso evidenti. Nell'ambito nella neoplasia, inoltre, erano talora evidenti aree di necrosi, emorragie recenti e macrofagi contenti emosiderina, come segno di pregresse emorragie.

##### **◆ Sertolioma "lipid rich"**

In 7 casi su 21 (33,33%) il tumore era composto da strutture tubulari analoghe a quanto descritto per la forma classica, ma rivestite da cellule di forma poligonale dotate di un citoplasma ricolmo di vacuoli lipidici otticamente vuoti (Fig.4). In alcuni casi il

citoplasma poteva contenere un unico vacuolo che spostava il nucleo verso la periferia, facendo assumere alla cellula neoplastica un aspetto ad anello con castone.

### **Indice mitotico**

Nei 13 casi di sertolioma classico l'indice mitotico variava da 0 a 0,9. In quelli d'aspetto "lipid rich" l'indice mitotico variava da 0 a 0,3.

Nel caso del sertolioma metastatizzante l'indice mitotico era pari ad 1,6 il più alto fra tutti i tumori considerati. Le mitosi, inoltre, avevano aspetto atipico.

### **SERTOLIOMI: ESAME IMMUNOISTOCHEMICO**

In generale, tutti i 21 casi compresi nella nostra casistica sono risultati positivi ad almeno due markers su 5.

Indipendentemente dalla morfologia e dal comportamento biologico, il numero di cellule positive variava da meno del 5% al 71-100%. Per tutti i markers presi in considerazione, le cellule positive ai vari markers potevano essere la maggioranza all'interno di un tubulo, oppure limitarsi ad un numero esiguo. Inoltre, tubuli neoplastici fortemente positivi potevano trovarsi nelle immediate vicinanze o addirittura confinare con tubuli completamente negativi o caratterizzati da uno scarso numero di cellule del Sertoli positive.

Infine, all'interno della stessa neoplasia, aree neoplastiche sovrapponibili, spesso esprimevano più di un marker. In quest'ultimo caso parliamo di "co-espressione" di markers immunoistochimici.

Nel dettaglio:

**Vimentina:** tutti i 21 sertoliomi, indipendentemente dal pattern di crescita e dal tipo morfologico, risultavano positivi per questo marker.

L'estensione dell'espressione era limitata ad alcune cellule in 6 casi (++) , ben distribuita in 5 casi (+++) e diffusa in 10 casi (++++) (Fig.5).

**Inibina- $\alpha$ :** la positività all' inibina era rilevabile in 13/21 tumori esaminati (Fig.6).

L'estensione dell'espressione era limitata a meno del 5% di cellule (+) in 1 caso, ad alcune cellule in 5 casi (++) , ben distribuita in 7 casi (+++).

**CKAE1/AE3:** In 7/21 sertoliomi si osservava la presenza di citocheratine.

L'estensione dell'espressione era limitata ad alcune cellule in 4 casi (++) , ben distribuita in 3 casi (+++) (Fig.7).

**Desmina:** questo marker era espresso da 5/21 dei tumori considerati.

L'estensione dell'espressione era limitata ad alcune cellule in 2 casi (++) , e ben distribuita in 3 casi (+++) (Fig.8).

**AMH:** era espresso in tutti i 16 i campioni analizzati. La maggioranza dei campioni (12/16) era diffusamente positiva (+++/++++) (Fig. 9 e 10). In 3 campioni la positività era limitata ad alcune cellule (++) , mentre un solo campione mostrava una positività ristretta a meno del 5% di cellule (+).

In definitiva, nei vari tumori, indipendentemente dal pattern di crescita, dalla morfologia cellulare e dal comportamento biologico, vimentina e AMH erano sempre espressi dalle cellule neoplastiche, anche se in percentuali diverse. La maggior parte dei sertoliomi, inoltre, coesprimeva anche gli altri marker.

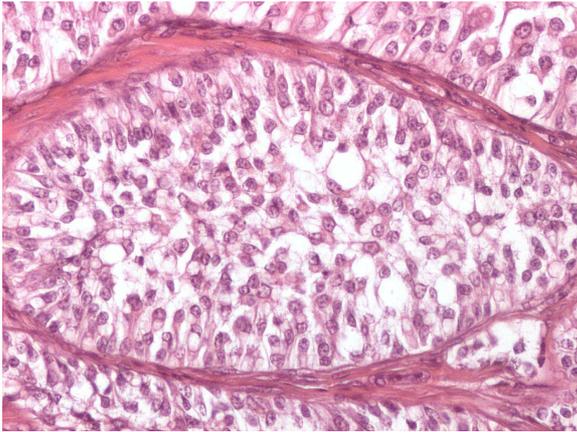
**Tab 1 . Risultati immunoistochimici: sertoliomi**

<i>Caso no.</i>	<i>Prot. no.</i>	<i>Razza</i>	<i>Età (anni)</i>	<i>Variante</i>	<i>Crescita</i>	<i>IM</i>	<i>VIM</i>	<i>INH <math>\alpha</math></i>	<i>CK AE1/AE3</i>	<i>DES</i>	<i>AMH</i>
1	599/06	Rodesian Ridgback	7	T	I/D	0.2	++	+++	-	++	++
2	693/06	Setter	13	LR	I/D	0.1	++++	+++	-	-	+++
3	795/06	incrocio	14	T	I	0	++++	+	-	-	++
4	668/05	Alaskan Malamute	7	T	I	0	+++	-	-	+++	+++
5	694/05	Dalmata	11	T	I/D	0.2	++++	++	-	-	NN
6	842/05	Pastore maremmano	12	LR	I	0.1	++++	-	+++	-	++++
7	1581/05	Scottish terrier	9	LR	I/D	0.1	++++	+++	++	++	NN
8	1496/06	Pastore tedesco	7	T	I/D	0.3	++	++	-	-	++++
9	563/08	Collie	7	T	I, Colexner bodies	0	++	-	-	-	++
10	842/08	Setter	12	T	I	0.4	+++	+++	-	-	++++
11	990/08	Beagle	13	T	I, Colexner bodies	0	++++	-	-	+++	+++
12	415/02	incrocio	11	T	I	0	++	-	+++	-	+++
13	464/02	Cocker spaniel	8	LR	I	0.1	++++	++	-	-	++++
14	981/02	Bassotto	10	T	I	0.9	++	+++	-	-	NN

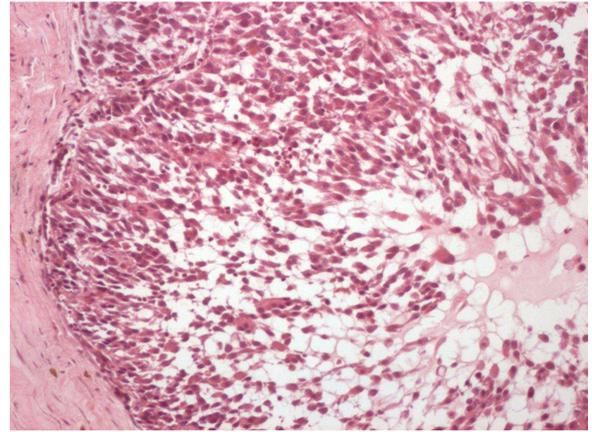
<i>Caso no.</i>	<i>Prot. no.</i>	<i>Razza</i>	<i>Età (anni)</i>	<i>Variante</i>	<i>Crescita</i>	<i>IM</i>	<i>VIM</i>	<i>INH <math>\alpha</math></i>	<i>CK AE1/AE3</i>	<i>DES</i>	<i>AMH</i>
15	1149/02	Schnauzer medio	8	LR	I	0.3	+++	-	-	-	+++
16	1547/02	Boxer	8	T	I/D	0.1	++++	+++	-	-	NN
17	1581/02	Pechinese	3	T	I	0.2	+++	+++	++	-	++++
18	1619/02	Cocker spaniel	7	LR	I	0.2	++	++	-	-	NN
19	1660/02	Boxer	5	T	I/D	0.2	+++	-	+++	-	+
20	160/07	Incrocio	15	LR	I/D	0	++++	++	++	+++	++++
21	745/98	Boxer	3	Poco differenziato	I/D	1.6	++++	-	++	-	+++

+= < 5% di cellule positive; ++= da 6-30% di cellule positive; +++ = da 31-70% di cellule positive; ++++= da 71-100% di cellule positive.

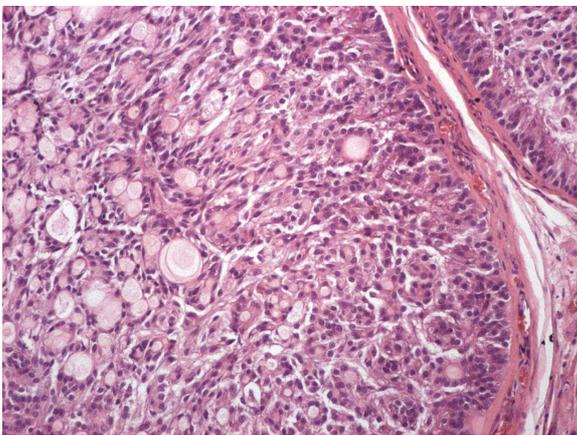
IM= indice mitotico; T= typical; LR= lipid rich; I= intratubulare; D= Diffuso; I/D=da intratubulare a diffuso. NN= non effettuato.



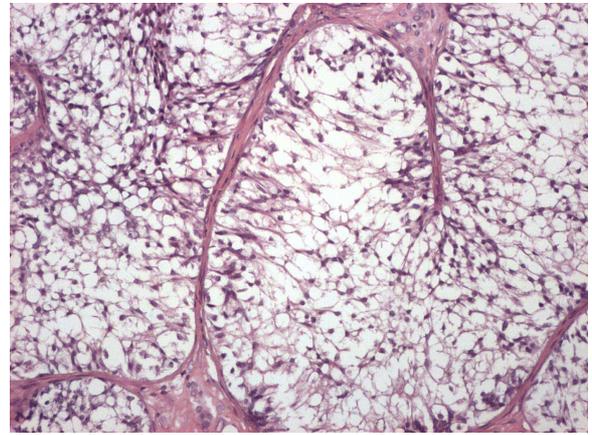
**Fig. 1** Sertolioma classico. I tubuli neoplastici sono separati da spessi setti stromali, EE. 200x.



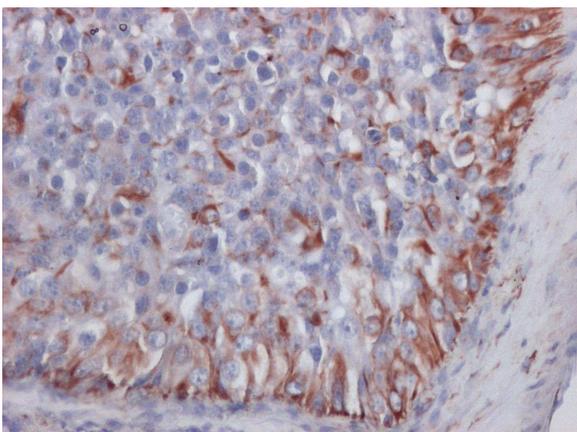
**Fig. 3** Sertolioma maligno metastatizzante. Si noti la crescita solida, su più file, delle cellule neoplastiche, caratterizzate da grave anisocitosi ed anisocariosi, EE. 100x.



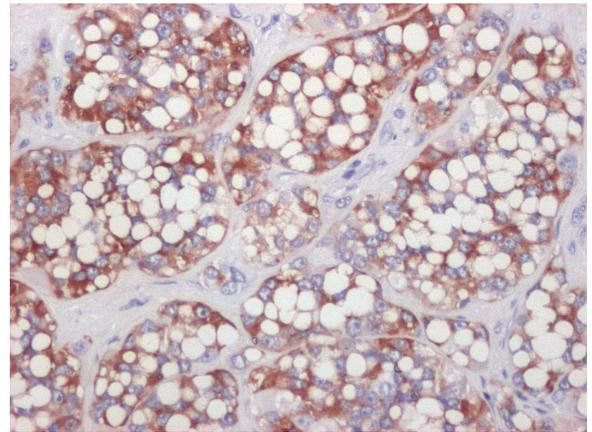
**Fig. 2** Sertolioma classico. I tubuli neoplastici contengono numerosi Call-Exner bodies, EE, 100x.



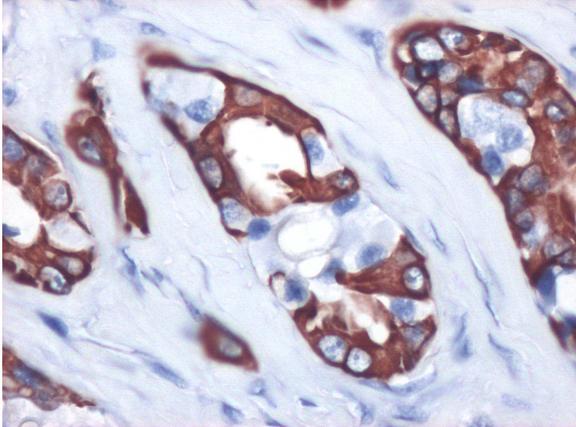
**Fig. 4** Sertolioma *lipid rich*. I tubuli neoplastici sono rivestiti da cellule dotate di un citoplasma ricolmo di vacuoli otticamente vuoti, EE. 100x



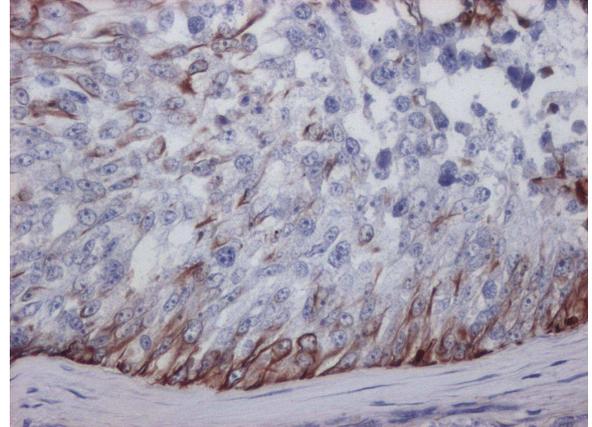
**Fig. 5.** Sertolioma classico. Immunoistochimica per vimentina. Si notino le cellule tumorali marcatamente positive. 200X.



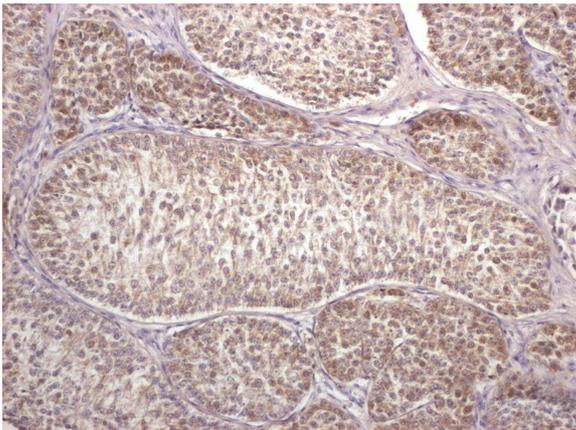
**Fig. 6.** Sertolioma *lipid rich*. Immunoistochimica per INHα. Si notino le cellule tumorali marcatamente positive.100x



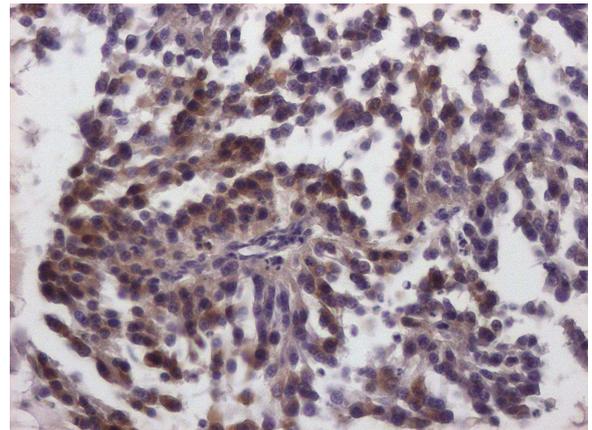
**Fig. 7.** Sertolioma classico. Immunoistochimica per CK AE1/AE3. Si notino le cellule neoplastiche marcatamente positive. 400x



**Fig. 8** Sertolioma classico. Immunoistochimica per desmina. Si notino le cellule neoplastiche marcatamente positive. 200x.



**Fig. 9.** Sertolioma classico. Immunoistochimica per AMH. Si notino le cellule neoplastiche marcatamente positive. 100x.



**Fig. 10.** Sertolioma maligno metastatizzante. Immunoistochimica per AMH. Si notino le cellule neoplastiche marcatamente positive. 100x

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il sertolioma è un tumore frequente nella specie canina che generalmente mostra un comportamento benigno, anche se sono stati segnalati rari casi maligni e metastatizzanti.

Nonostante la sua frequenza, i lavori che lo riguardano sono assai scarsi in letteratura e, in special modo, quelli che ne esaminano gli aspetti immunoistochimici.

Il presente studio è stato elaborato per dare un contributo in questo senso.

Per tutti i campioni è stato eseguito un esame istologico con colorazione di routine ed un esame immunoistochimico comprendente numerosi markers, considerati tipici delle cellule del Sertoli.

Venti/21 tumori presi in considerazione si riferivano a sertoliomi benigni. Un solo tumore, al contrario, a distanza di 2 anni aveva dato una metastasi pararenale, con caratteristiche istologiche sovrapponibili alla lesione testicolare, e pertanto è stato considerato come sertolioma maligno metastatizzante. Tuttavia, poiché di tale massa era a noi pervenuta solo una limitata porzione e poiché all'interno di essa non sono stati rilevate strutture linfoidi, non è stato possibile affermare con certezza se si trattasse di una recidiva o di una localizzazione metastatica linfonodale. Quest'ultima ipotesi sembrerebbe però la più probabile, in quanto la massa primaria intraddominale si era sviluppata all'interno di un testicolo ritenuto, escisso completamente e localizzato dal lato opposto.

Per quanto riguarda gli aspetti istologici delle neoplasie considerate, 12/21 avevano crescita intratubulare, e 9/21 crescita da intratubulare a diffusa.

Tredici/20 casi benigni mostravano aspetti morfologici tipici, mentre in 7/20 casi si è osservata la presenza di cellule neoplastiche con citoplasma schiumoso e vacuolizzato, che ha portato alla classificazione di questi tumori come sertolioma *lipid rich*. Tale variante di sertolioma è riportata nella classificazione dei tumori testicolari umani edita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) (Mostofi e Sesterhenn, 1998). Nell'analogo volume relativo ai tumori testicolari degli animali, nella sezione riservata al sertolioma, tale variante non è riportata. Essa andrebbe invece considerata in una futura edizione, in quanto già segnalata nel cane da Peters e collaboratori (2001) ed anche perché essa, per le caratteristiche delle cellule neoplastiche, può essere confusa con un adenoma delle cellule di Leydig.

Inoltre, in due casi è stata rilevata la presenza di strutture definite *Call-Exner bodies* principalmente descritte, sia all'interno del WHO umano che veterinario, nei follicoli

secondari ovarici e nei tumori della granulosa e descritte raramente nei sertoliomi (Dow *et al.*, 1962).

Per quanto riguarda l'unico *sertolioma maligno* metastatizzante incluso nella nostra casistica, questo mostrava caratteristiche istologiche compatibili con quanto già descritto in letteratura sia nel cane (Coffin *et al.*, 1952; Scully e Coffin, 1952; Brodey e Martin, 1958; Peters *et al.*, 2001) che nell'uomo (Talerman, 1971; Nielsen e Jacobsen, 1988; Kolon e Hochman, 1997; Kronz *et al.*, 1998). La neoplasia, infatti, tendeva alla crescita solida ed infiltrante, era caratterizzata da ampie aree emorragiche e necrotiche, ed era composta da cellule neoplastiche caratterizzate da marcati aspetti di anisocitosi ed anisocariosi.

Quanto all'indice mitotico, che risultava nei 20 tumori benigni piuttosto basso (da 0 a 0.9 mitosi per campo a 400X), nel sertolioma maligno esso era decisamente superiore, pari a 1.6. Questo concorda con quanto osservato da Dow (1962), che nei casi benigni registrava un indice mitotico piuttosto basso, da 0.1 a 1, mentre nei casi maligni l'indice mitotico variava da 0.8 a 3.

Per quanto riguarda gli aspetti immunocistochemici, se compariamo i dati emersi dal presente studio con quelli ottenuti nel primo studio esposto in questa Tesi, notiamo come, nella maggior parte dei sertoliomi, tornino ad essere espressi markers cellulari che non dovrebbero più caratterizzare la cellula del Sertoli adulta, e che, come tali, sono indice di sdifferenziazione ed immaturità cellulare (Banco *et al.*, 2010; Banco *et al.*, 2011; Grieco *et al.*, 2011).

E' stato infatti dimostrato che, tra i markers strutturali, solo la **vimentina** sia un marker proprio della cellula del Sertoli canina, in quanto costantemente espressa, sia nelle varie fasi di sviluppo testicolare che nei sertoliomi, mentre gli altri markers studiati appaiono esclusivamente in gonadi immature e/o neoplastiche.

Per quanto riguarda **citocheratine** e **desmina**, essi non sono markers espressi normalmente dalle cellule del Sertoli di cane e appaiono esclusivamente nei tumori, come è stato osservato dal nostro studio e da Yu *et al.*, 2009, che registrava una positività per desmina seppure focale e limitata a 5/15 tumori. Anche nel nostro lavoro i sertoliomi positivi per desmina sono pochi (5/21, 23.80%) ma il numero di cellule del Sertoli positive per questo marker, all'interno delle neoplasie reattive, risultava in genere abbastanza consistente.

In letteratura mancano studi inerenti le tempistiche di espressione di citocheratine e desmina correlati all'embriogenesi testicolare canina, ma dai dati segnalati in medicina umana, e negli animali da laboratorio, si evince come questi siano marker di estrema

immaturità, rilevati in medicina umana solo in feti tra il 3° e il 4° mese di gravidanza (Rogatsch *et al.*, 1996) e che accompagnano in maniera transitoria i mutamenti di forma cui la cellula del Sertoli va incontro durante la differenziazione della gonade.

E' verosimile ipotizzare che questo avvenga anche nel cane anche se, per il momento, non può essere affermato con certezza. Nella nostra casistica, infatti, mancavano feti di poche settimane di gestazione. E' interessante, però, osservare come, sia desmina che citocheratine siano presenti nei sertoliomi indipendentemente dal comportamento biologico e dalla morfologia cellulare. In medicina umana, oltre al sertolioma, vi sono molte altre patologie testicolari che causano infertilità nelle quali è stata dimostrata l'espressione di markers fetali (CKs, desmina e AMH) nelle cellule del Sertoli.

Per esempio, in studi condotti su parenchima testicolare di uomini azoospermici è stato dimostrata, da parte delle cellule del Sertoli, positività alle CKs (Bar-Shira Maymon *et al.*, 2000). L'espressione di tali markers, da parte dell' epitelio seminifero adulto, è stata interpretata come una riacquisizione patologica di un fenotipo immaturo, segno che tali cellule sono andate in contro ad un certo grado di sdifferenziazione cellulare. Risultati analoghi sono stati ottenuti in studi condotti su scimmie rhesus con criptorchidimo testicolare indotto sperimentalmente, in modo tale da causare l'assenza di una normale spermiogenesi. Le cellule del Sertoli delle gonadi ritenute non solo mostravano una diffusa positività alla CK18 (mai osservata nel testicolo controlaterale scrotale e caratteristica, invece, del testicolo normale di soggetti imuberi), ma anche una più rara positività per desmina, interpretata come segno ancora più grave di de-differenziazione cellulare (Rogatsch *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2004). Il motivo per il quale si assista a tale fenomeno non è ancora stato chiarito, anche se sono state avanzate varie ipotesi. Il riapparire di questi markers che di per sé non dovrebbero essere presenti in testicoli adulti, può essere considerato un evento basilare che indica il fallimento della maturazione delle cellule del Sertoli o la regressione delle cellule del Sertoli ad uno stadio meno differenziato a causa dell'assenza di una normale progressione nella spermatogenesi oppure ad un completo arresto di quest'ultima (Rogatsch *et al.*, 1996; Sharpe *et al.*, 2003). Per altri autori, invece, la presenza di citocheratine in cellule del Sertoli adulte indica una disabilità funzionale (Bergmann e Kliesh, 1994) o addirittura un marker delle cellule germinali degenerate (Romeo *et al.*, 1995).

Per quanto invece riguarda l'AMH e l' INH- $\alpha$ , markers testicolari funzionali, questi hanno invece un comportamento simile: entrambi, infatti, sono presenti esclusivamente

in cuccioli neonati e assenti in animali prepuberi e adulti, ma ricompaiono nuovamente in cellule del Sertoli neoplastiche (Banco *et al.*, 2011; Grieco *et al.*, 2011).

Più precisamente, nei sertoliomi, l'**AMH** si è rivelato essere un marker espresso in maniera costante. Solo in un campione la reattività immunostochimica si limitava a poche cellule, mentre negli altri casi variava dal 6% al 100%. All'interno dei tubuli neoplastici, le cellule positive potevano essere la maggioranza oppure limitarsi ad un numero esiguo, così come, in numerosi campioni, si è osservata la presenza di tubuli neoplastici fortemente positivi accanto a tubuli del tutto negativi. Questo concorda con quanto osservato da Rey e collaboratori (2000), l'unico studio nel quale viene indagata, grazie all'immunostochimica, l'espressione di AMH in sertoliomi umani. In questo lavoro, sebbene il numero di cellule neoplastiche positive fosse inferiore a quello da noi riscontrato, l'AMH veniva indicato come un buon marker immunostochimico nella diagnosi dei tumori delle cellule della granulosa e del Sertoli.

In medicina umana, inoltre, l'espressione immunostochimica di AMH da parte delle cellule del Sertoli è stata descritta per altre importanti patologie testicolari non neoplastiche ma disgenetiche (*SCO tubules*, *testicular dysgenesis syndrome*, sindromi da interesse, insensibilità recettoriale agli androgeni, persistenza dei dotti di Müller) (Steger *et al.*, 1996; Rey *et al.*, 1996; Steger *et al.*, 1999; Sharpe *et al.*, 2003), oppure relative ad alterata fertilità (Steger *et al.*, 1996). Tali dati pongono delle buone basi per l'indagine, in un prossimo futuro, dell'espressione di AMH in alterazioni testicolari che la specie canina condivide con l'uomo, quali, per esempio, l'atrofia, gli *SCO tubules* e la *testicular dysgenesis syndrome* (Grieco *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda, infine, l'espressione di **INH- $\alpha$**  nei sertoliomi canini, dai nostri risultati risulta che tale marker sia espresso in maniera abbastanza consistente nei tumori analizzati (61,90%). I nostri dati sono in accordo con quelli di Yu e collaboratori (2009) che osservarono l'espressione di INH- $\alpha$  nel 93% dei 15 sertoliomi canini inclusi nella loro casistica, ma in contrasto con il lavoro di Tanyama e collaboratori (2001) nel quale non era stata riscontrata alcuna positività nei sertoliomi da loro analizzati. Va considerato, però, che il risultato negativo di Tanyama potrebbe essere dovuto al numero limitato di campioni utilizzati per lo studio (solo 5 sertoliomi).

Pertanto, alla luce di quanto abbiamo osservato nei testicoli di cane normali e patologici, possiamo concludere che, nel cane, la positività per INH- $\alpha$ , può essere considerata un marker di immaturità, in quanto espressa solo nei testicoli neonatali e nei sertoliomi.

Va inoltre puntualizzato che, per quanto riguarda l'espressione di INH- $\alpha$  da parte delle cellule del Sertoli, esiste una sostanziale differenza specie-specifica tra uomo e cane. Infatti, nell'uomo l'INH- $\alpha$  è considerata uno dei marker d'elezione per le cellule del Sertoli, espressa costantemente sia dalle normali cellule fetali, neonatali ed adulte (Vliegen *et al.*, 1993; Majdic *et al.*, 1997) che dalle cellule del Sertoli neoplastiche (Majdic *et al.*, 1997; Kommos *et al.*, 2000; Brehm *et al.*, 2006). Mentre nel cane sono solo le cellule del Sertoli immature neonatali e tumorali ad essere positive per INH- $\alpha$  (Yu *et al.*, 2009; Grieco *et al.*, 2011).

Lo scopo del precedente lavoro, propedeutico a questo, era stato quello di caratterizzare l'immunofenotipo della cellula del Sertoli canina.

A questo fine, erano stati selezionati testicoli normali di cani di diversa età, a partire dalle ultime settimane di gestazione fino a soggetti di età adulta, ed era stata valutata la reattività immunoistochimica di markers comunemente impiegati in diagnostica umana e veterinaria. Tale studio, basato appunto su campioni normali, ci ha concesso di evidenziare, nella specie canina, i markers tipici di una cellula che, nel corso del proprio sviluppo morfofunzionale, va incontro a numerosi cambiamenti. In questo modo, è stato possibile risalire alla sequenza temporale della comparsa di tali markers, dall'età prenatale fino a quella adulta, con l'obiettivo di fare chiarezza sul meccanismo che sta alla base della loro eventuale ri-espressione nei disturbi del testicolo adulto. Nel presente lavoro, quindi, ci si è focalizzati sul fenotipo della cellula del Sertoli neoplastica e l'esame immunoistochimico condotto su 21 casi di sertoliomi canini, ha permesso di dimostrare, nelle forme tumorali, la comparsa di markers sia strutturali che funzionali, tipici della cellula del Sertoli immatura. Tali markers, presenti esclusivamente nelle cellule del Sertoli fetali, neonatali e di soggetti impuberi tornano ad essere espressi nelle forme neoplastiche, e ciò significa che le cellule del Sertoli che le compongono si allontanano dal fenotipo che dovrebbe caratterizzarle, e vanno incontro a differenti gradi di sdifferenziazione cellulare. Tale processo sembra essere indipendente sia dalla morfologia che dal comportamento biologico dei tumori, in quanto nei campioni che abbiamo analizzato non è stata mai osservata alcuna correlazione tra i tipi di marker espressi, il numero di cellule positive all'esame immunoistochimico, il comportamento biologico della massa o il modello di crescita e la variante del tumore.

Inoltre, è stato dimostrato come l'AMH, mai testato su sezioni di testicolo canino neoplastico, sia un marker costantemente espresso dal sertolioma, e come tale possa avere un'importante valenza diagnostica, così come accade in medicina umana.

## **CAPITOLO 3**

**STUDIO IMMUNOISTOCHIMICO**

**SULL'ESPRESSIONE**

**DEL MARKER HBME-1**

**NEI TUMORI OVARICI DEL CANE**

## PREMESSA

In medicina umana, vi è una attenzione sempre crescente riguardo i tumori ovarici, neoplasie poco sintomatiche e spesso tardivamente diagnosticate. Una corretta diagnosi istologica, per questo tipo di tumori, è essenziale, infatti, mentre le neoplasie ovariche epiteliali presentano un comportamento biologico spesso maligno ed aggressivo, quelle di derivazione stromale, sono realtivamente benigne, e pertanto associate ad una prognosi più favorevole.

Dato però che questi due tipi di neoplasie condividono spesso caratteri morfologici simili, in medicina umana sono stati effettuati numerosi studi con il preciso scopo di riuscire a giungere ad una diagnosi differenziale sicura. Tali studi si avvalgono della tecnica immunoistochimica, la quale, attraverso l'impiego di anticorpi mirati, riesce a discriminare tra i diversi tipi cellulari.

Nel caso delle neoplasie ovariche, la diagnosi differenziale è inoltre complicata dal fatto che alcuni antigeni risultano contemporaneamente espressi sia dalle cellule epiteliali che da quelle stromali. Anche se, sembrano essere stati recentemente individuati alcuni markers più specifici. Pertanto, nel corso degli anni, si è arrivati alla formulazione di pannelli composti da numerosi anticorpi da applicare alla diagnostica immunoistochimica delle neoplasie di derivazione ovarica.

In medicina veterinaria, dal momento che le neoplasie ovariche del cane sono argomento poco dibattuto e se ne ignora perfino la reale incidenza, gli studi in materia sono scarsi e frammentari.

Dal punto di vista immunoistochimico, i lavori che indagano il profilo fenotipico dell'ovaio normale e neoplastico sono molto pochi e spesso mostrano risultati contrastanti. Inoltre, nel cane, al pari dell'uomo, i quadri istologici delle neoplasie ovariche sono spesso sovrapponibili o contraddittori.

In una precedente pubblicazione veniva dato un contributo alla diagnostica dei tumori ovarici canini impiegando anticorpi diretti contro inibina  $\alpha$  e citocheratina 7 per discriminare rispettivamente tra tumori gonadostromali e tumori di derivazione epiteliale (Riccardi *et al.*, 2007). Partendo da tali risultati, il presente lavoro si prefigge di ampliare le conoscenze riguardanti le neoplasie ovariche

canine utilizzando un marker di comprovata utilità nella diagnostica differenziale dei tumori ovarici umani e mai impiegato nel cane.

Tale marker, l'HBME-1, potrebbe permettere di ampliare, infatti, il pannello immunostochimico delineato per i tumori ovari del cane, rendendo sempre più precisa la diagnosi definitiva.

## **INTRODUZIONE**

### **L'OVAIO**

#### **Anatomia macroscopica**

L'ovaio è un organo pari ed esplica due funzioni: gametogena, assicurando l'oogenesi, ed endocrina, regolando l'attività genitale (Barone, 1994).

Nel cane, l'ovaio appare di colore grigio-rosa, di consistenza dura e un poco elastica ed è situato a breve distanza dal polo caudale del rene corrispondente, a livello della terza o quarta vertebra lombare e ad 1 cm dall'estremità corrispondente del corno uterino (Barone, 1994).

Nella cagna adulta ogni ovaio è lungo da 15 a 20 mm, alto 10-15 mm e spesso 8-10 mm (Barone, 1994).

Per la sua forma ovoidale leggermente schiacciata, l'ovaio offre alla descrizione due facce, due margini e due estremità. Le facce sono distinte in laterale e mediale, sono entrambe convesse e hanno superficie liscia o irregolare a seconda dello sviluppo dei vari componenti ovarici. Dei margini, uno riceve l'inserzione del mesovario e presenta l'ilo; l'altro è libero. Delle estremità, una è in genere orientata cranialmente e guarda la tuba uterina, l'altra è volta verso l'utero ed è connessa a questo organo mediante il legamento proprio dell'ovaio (Pelagalli, 2003).

Nella cavità addominale, ciascun ovaio si trova in posizione sottolombare, sospeso alla volta della cavità addominale da un mesovario che è una dipendenza dei legamenti larghi (Pelagalli, 2003).

In questo meso passano i vasi sanguigni e linfatici e anche i nervi diretti all'ovaio i quali entrano nell'organo (ilo dell'ovaio) sul margine lungo il quale il mesovario si attacca all'ovaio. In modo molto tipico è conformata la mesosalpinge che nella cagna è rappresentata da una particolare piega laterale del mesovario e costituisce la parte principale della parete della borsa ovarica nella quale, insieme con abbondante tessuto adiposo, si trova l'ovaio celato alla vista. L'accesso alla cavità della borsa è una stretta fessura situata sul lato mediale, lunga da 0,2 a 1,8 cm. Dorsalmente a questa fessura l'ovaio è percepibile al

tatto per la sua consistenza. La borsa ovarica ha una profondità media di 2,5-5 cm e una larghezza di 0,5-3,5 cm (Nickel, 2006).

### **Anatomia microscopica**

L'ovaio è rivestito da un epitelio superficiale che deriva, con qualche modificazione, dal peritoneo viscerale che riveste l'organo ed è in continuità con il mesovario. Sotto l'epitelio è inoltre presente una capsula di tessuto connettivo fibroso che può avere una configurazione lamellare e costituisce la tonaca albuginea dell'ovaio, che è simile alla corrispondente del maschio anche se più sottile (Banks, 1991).

Al di sotto di tale capsula sono presenti, nella cagna, cordoni, tubuli e nidi di cellule denominati *subsurface epithelial structures* (SES), i quali sono molto evidenti in certi stadi di sviluppo nell'ovaio fetale e nel cane anziano (MacLachlan e Kennedy, 2002).

Le ovaie della maggior parte degli animali sono formate da due zone distinte: una corticale (o zona parenchimatosa) e una midollare (o zona vascolare).

La corticale contiene numerosi follicoli a vari stadi di sviluppo, corpi lutei, cellule interstiziali ed elementi dello stroma. Il tessuto connettivo che costituisce lo stroma della corticale deve essere considerato un tessuto specializzato; infatti anche se sono presenti diversi tipi cellulari tipici del connettivo lasso, nell'insieme il tessuto appare iperplastico con ammassi di "fibroblasti", i quali possono essere paralleli alla superficie o disposti in maniera isolata intorno ai follicoli o ai vasi. I fibroblasti di questa regione non sono comuni fibroblasti, in quanto hanno proprietà adattative e pleomorfe e spesso assumono caratteri di cellule epitelioidee come accade nella teca del follicolo e nella ghiandola interstiziale (Banks, 1991).

La midollare è in stretto rapporto con l'ilo e consta di connettivo piuttosto lasso tra le cui maglie trovano posto ampi spazi linfatici, reti di vasi sanguigni, nervi e piccoli gruppi di cellule a funzione endocrina, le cellule ilari, che hanno caratteristiche simili a quelle delle cellule interstiziali del testicolo. In questa zona, le arterie assumono un caratteristico andamento tortuoso (Banks, 1991; Pelagalli, 2003).

## **Sviluppo dei follicoli**

Solo una minima parte dei follicoli prende parte al processo di accrescimento e di maturazione. Tale processo di maturazione del follicolo primario inizia alla pubertà e persiste fino alla perdita della capacità riproduttiva (Banks, 1991).

Un follicolo ovarico è un accumulo sferico di cellule contenente il gamete che si sta sviluppando.

Il ciclo continuo dello sviluppo dei follicoli è caratterizzato da fasi ben distinte: follicolo primordiale, follicolo primario, follicolo secondario, follicolo terziario, follicolo maturo (Banks, 1991).

Contemporaneamente alla differenziazione degli ovociti primari, un singolo strato di cellule mesodermiche appiattite, le cellule follicolari, va a rivestire l'ovocita primario costituendo il follicolo primordiale che contiene quindi un ovocita primario. Queste formazioni, dette anche follicoli quiescenti, si trovano singolarmente o riunite in gruppi alla periferia della corticale (Banks, 1991).

L'attivazione del follicolo primordiale comporta dei cambiamenti nell'ovocita primario e nelle cellule follicolari che determinano la formazione del follicolo primario, le cui cellule follicolari diventano cubiche o cilindriche.

Il follicolo secondario è caratterizzato sia da un aumento numerico delle cellule follicolari, che vanno incontro a continue mitosi, costituendo la membrana granulosa, sia dallo sviluppo di una zona pellucida, una sostanza amorfa PAS-positiva, fra queste e l'ovocita primario (Banks, 1991).

Le cellule dello stroma si differenziano in due strati: teca interna e teca esterna del follicolo, separate dalle cellule della granulosa da una membrana basale.

La teca interna è formata di voluminose cellule epitelioidi e da un'estesa rete vascolare, mentre la teca esterna è formata da uno strato di fibroblasti modificati. L'attività secernente delle cellule della granulosa determina lo sviluppo del follicolo terziario o vescicoloso. Durante lo sviluppo dell'antro sono evidenti piccoli spazi PAS-positivi ripieni di liquor folliculi, i cosiddetti corpi di Call-Exner che confluiscono e formano l'antro follicolare (Banks, 1991).

L'ovocita primario è ora rivestito da un ammasso di cellule della granulosa in continuità con la membrana granulosa periferica, chiamato cumulo ooforo, le cui cellule che si trovano a diretto contatto con l'ovocita primario diventano

cilindriche e si dispongono radialmente a formare la corona radiata. Queste cellule presentano dei prolungamenti citoplasmatici che penetrano nella zona pellucida entrando in contatto con i microvilli della cellula uovo (Banks, 1991). Le cellule del cumulo ooforo costituiscono una specie di strato viscerale di cellule della granulosa separate per mezzo dell'antro follicolare dallo strato periferico di cellule della granulosa che si presenta come un accumulo multistratificato di cellule poliedriche, lo strato granuloso, la cui porzione basale poggia su una membrana basale che separa queste cellule da quelle della teca interna del follicolo. Malgrado i cambiamenti cui vanno incontro le cellule della granulosa e della teca, il follicolo vescicoloso contiene ancora un ovocita primario (Banks, 1991).

I follicoli maturi o di Graaf sono chiamati anche follicoli preovulatori, sono strutture molto grandi che formano una protuberanza sulla superficie dell'ovaio e si spingono in profondità nella corticale. Per ovulazione si intende la rottura del follicolo e la liberazione dell'ovocita. I rivestimenti tecali del follicolo e i componenti corticali diventano sottili e il follicolo sporge dalla superficie dell'ovaio nel punto di rottura, detto stigma. Ciò che resta del follicolo non degenera, ma va incontro a notevoli cambiamenti che portano alla formazione del corpo luteo. Alla fine dell'emorragia che accompagna l'ovulazione, si forma una struttura transitoria, denominata corpo emorragico, che deriva dalla coagulazione. Il processo mediante il quale le cellule della granulosa e della teca interna si trasformano in cellule luteiniche viene chiamato luteinizzazione ed è caratterizzato da ipertrofia, iperplasia e accumulo di pigmento (luteina) e altri lipidi e porta alla formazione del corpo luteo (Banks, 1991).

In caso di mancata fecondazione, il corpo luteo ciclico degenera lentamente e viene sostituito da tessuto connettivo: si forma così il corpo albicante (Banks, 1991).

## Endocrinologia dell'ovaio

L'ovaio funziona anche come ghiandola endocrina, secernendo estrogeni e progesterone. La funzione endocrina dell'ovaio è regolata dalle gonadotropine (FSH = ormone follicolostimolante e LH = ormone luteinizzante) secrete dall'ipofisi la cui attività è regolata dai fattori di rilascio ipotalamici (fattore di rilascio per LH e fattore di rilascio per FSH). Sotto l'influenza dell'LH, le cellule della teca interna producono due androgeni, l'androstenedione ed il testosterone; mentre l'FSH stimola le cellule della granulosa a produrre estrogeni, soprattutto il 17- $\beta$ -estradiolo. Gli androgeni prodotti dalla teca raggiungono le cellule della granulosa dove particolari enzimi li trasformano in estrogeni, i quali, a loro volta, raggiungono l'antro in via di sviluppo e stimolano la proliferazione delle cellule della granulosa e l'accrescimento del follicolo. Anche la ghiandola interstiziale produce estrogeni.

Inoltre le cellule della granulosa producono un ormone proteico, la follicolostatina, che ha un effetto feed-back negativo sulla produzione di FSH (Banks, 1991).

Il progesterone è prodotto soprattutto dalle cellule luteiniche della granulosa del corpo luteo; quest'ultimo produce anche un ormone polipeptidico, la relaxina, che ha la funzione di far rilasciare i legamenti interessati prima del parto (Banks, 1991).

Gli ormoni steroidei esercitano un effetto feed-back negativo sull'ipotalamo e sulla parte distale dell'ipofisi (Banks, 1991).

L'inibina è un ormone glicoproteico presente sotto forma di 2 molecole attive costituite da 2 subunità unite da un ponte disulfidico: la subunità  $\alpha$  può essere associata ad una delle due subunità  $\beta$ ,  $\beta_A$  o  $\beta_B$ , a formare le due isoforme, inibina A e inibina B (De Jong *et al.*, 1990; Hayes *et al.*, 1998; Luisi *et al.*, 2005). La struttura primaria delle subunità dell'inibina mostra omologia con quella di un certo numero di fattori di crescita e differenziazione, per esempio l'AMH (Anti Müllerian Hormone) e TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) (De Jong, 1988; Ying, 1988; de Kretser e Robertson, 1989; De Jong *et al.*, 1990). L'inibina viene prodotta a livello delle gonadi dalle cellule del Sertoli nel maschio e, secondo la maggior parte degli autori, dalle cellule della granulosa nella femmina (de

Kretser e Robertson, 1989; De Jong *et al.*, 1990; Burger, 1992; Rishi *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2000; Cathro *et al.*, 2005). L'inibina e le sue subunità vengono però espresse anche in un gran numero di tessuti oltre alle gonadi (Meunier *et al.*, 1988; De Jong *et al.*, 1990), e persino nelle gonadi stesse sono state rilevate all'esterno delle cellule che sono ritenute essere la fonte di inibina e cioè a livello di cellule della teca (De Jong *et al.*, 1990; Hayes *et al.*, 1998; Luisi *et al.*, 2005). Infatti, questa glicoproteina viene prodotta anche dalle cellule dell'epitelio prostatico, dagli spermatozoi, dall'epididimo, dalla placenta e dall'endometrio (Garde *et al.*, 1988; Garde e Sheth, 1989; de Kretser e Robertson, 1989; Burger, 1992; Rishi *et al.*, 1997). L'ovaio rimane comunque il più importante sito di produzione di inibina circolante e lo dimostra il fatto che i livelli sierici di tale molecola diminuiscono rapidamente per poi scomparire dopo ovariectomia, com'è stato riscontrato in animali da esperimento e in pazienti umani con tumori ovarici (Robertson *et al.*, 1988; Jobling *et al.*, 1994; Puls *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2003).

Nonostante la secrezione di inibina sia stimolata dall'FSH e dall'LH e si verifichi primariamente durante la fase follicolare del ciclo mestruale (Schumer e Cannistra, 2003), l'inibina svolge un ruolo di grande importanza nel controllo della secrezione delle gonadotropine a livello ipofisario, tramite un meccanismo a feedback negativo, inibendo in particolare il rilascio dell'ormone follicolostimolante (Rivier *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 1988; De Jong *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1995; Rishi *et al.*, 1997; Cathro *et al.*, 2005; Luisi *et al.*, 2005)

La combinazione di due subunità  $\beta$  dell'inibina porta alla formazione dell'activina, una proteina che contrasta l'azione dell'inibina sulla secrezione ipofisaria dell'FSH stimolando la secrezione di tale gonadotropina (Ling *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 1988; de Kretser e Robertson, 1989; De Jong *et al.*, 1990; Rishi *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2003).

L'inibina e l'activina svolgono anche effetti di tipo autocrino e paracrino all'interno dell'ovaio. Nell'ovaio umano, è stato dimostrato che l'inibina induce un aumento della produzione di androgeni da parte delle cellule della teca: l'inibina, prodotta in quantità crescenti durante lo sviluppo dei follicoli ed immagazzinata nel fluido antrale, può raggiungere l'adiacente strato di cellule della teca e stimolare la

sintesi di androgeni LH-indotti (Zheng *et al.*, 2003; Luisi *et al.*, 2005). Questa premessa è supportata dalla considerazione che l'inibina A, in coltura, migliora il rilascio di androgeni LH-indotti da parte di cellule della teca (Hillier *et al.*, 1991). Poiché l'activina A stimola i recettori per l'FSH e migliora la proliferazione delle cellule della granulosa in vitro (Mather *et al.*, 1997), l'inibina, contrapponendosi all'activina, potrebbe bloccare l'attività activina-FSH e svolgere così una regolazione autocrina sulla proliferazione delle cellule della granulosa (Luisi *et al.*, 2005).

Inoltre, si pensa che l'inibina e l'activina svolgano un ruolo anche nell'oncogenesi. Infatti, studi condotti su topi, suggeriscono che l'inibina agisca come fattore di soppressione dello sviluppo di tumori nella gonade (Matzuk *et al.*, 1992; Matzuk *et al.*, 1996), mentre l'activina favorisca lo sviluppo di tumori gonadici per via autocrina (Shikone *et al.*, 1994; Di Simone *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2003). Questi risultati contrastano, però, con il fatto che in diversi studi condotti in medicina umana, sono stati riscontrati elevati livelli sierici di inibina in pazienti con tumori ovarici ed in particolare con tumori delle cellule della granulosa (De Jong *et al.*, 1990; Burger, 1992; Gurusinghe *et al.*, 1995; Flemming *et al.*, 1996; Rishi *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000; Schumer e Cannistra, 2003).

## LE NEOPLASIE DELL'OVAIO NEL CANE

### **Incidenza**

Le neoplasie dell'ovaio sono state descritte in tutte le specie animali, tendono a colpire soggetti di età avanzata e possono essere associate ad alterazioni del comportamento (Schlafer e Miller, 2007)

La reale prevalenza nel cane è difficile da definire perchè i dati presenti in letteratura sono alquanto discordanti. Nell'unico studio eseguito su campioni biotici, viene rilevata una prevalenza dell'1,2% (Cotchin, 1961), mentre la maggior parte dei dati riportati in letteratura, estrapolati da studi necroscopici, riportano un'incidenza, nelle femmine intere, pari al 6% (Dow, 1960; Klein, 2007), corrispondente allo 0,5-1,2% di tutte le neoplasie che interessano il cane (Klein, 2007).

Un'incidenza così bassa è senza dubbio dovuta al fatto che la maggior parte dei cani viene sterilizzata in età precoce (Klein, 2007).

I tumori ovarici nel cane sono segnalati in soggetti di età superiore ai 10 anni anche se raramente possono manifestarsi in animali più giovani (Morris e Dobson, 2003).

### **Classificazione istopatologica e comportamento biologico**

La classificazione si basa sulla derivazione dei costituenti cellulari predominanti di ogni tumore: l'epitelio dell'ovaio, le cellule germinali e lo stroma ovarico (MacLachlan, 1987; MacLachlan e Kennedy, 2002; Foster, 2006; Schlafer e Miller, 2007).

La classificazione delle neoplasie ovariche riportata in questo capitolo segue il sistema descritto nel fascicolo dei tumori dell'apparato genitale degli animali domestici, edito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) (1998).

#### **a. Tumori epiteliali**

Nel cane i tumori che derivano dall'epitelio ovarico rappresentano 40-50% dei tumori ovarici e si sviluppano nei soggetti con età compresa fra 4 e 15 anni (Klein, 2007).

La maggior parte di essi deriva dall'epitelio di superficie o dalle strutture epiteliali poste sotto la superficie (SES), strutture unicamente rilevabili nella specie canina (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998; Foster, 2006; Schlafer e Miller, 2007). Entrambe queste componenti derivano dal mesotelio celomatico (Kennedy *et al.*, 1998). Meno frequentemente, però, i tumori possono insorgere nell'ilo dell'ovaio a partire dalla rete ovarii (MacLachlan, 1987; MacLachlan e Kennedy, 2002; Foster, 2006). I tumori ovarici causano aumento di dimensioni ed alterazioni nel profilo della gonade affetta. Essi possono essere mono o bilaterali e apparire come neoformazioni cistiche o multinodulari, caratterizzate da cisti multiple contenenti un fluido giallo-brunastro frammiste ad aree solide (MacLachlan, 1987; MacLachlan e Kennedy, 2002).

I tipi istologici sono:

- adenomi papillari,
- adenocarcinomi papillari,
- cistadenomi papillari,
- carcinomi indifferenziati,
- adenomi della rete ovarii.

Gli adenomi papillari e i cistadenomi papillari, che sono comuni solo nella cagna, possono essere lisci e nodulari oppure possono dare all'ovaio un aspetto a cavolfiore se il tumore coinvolge la superficie. Questi tumori si sviluppano come proiezioni papillari dell'epitelio delle strutture epiteliali poste sotto la superficie dell'ovaio o, meno comunemente, come proiezioni papillari dalla superficie epiteliale dell'ovaio. Sono caratterizzati da stroma, costituito da scarso tessuto connettivo e da proiezioni papillari rivestite da piccole cellule cilindriche o cubiche che possono essere ciliate (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998; MacLachlan e Kennedy, 2002). Le mitosi sono rare. A volte, le cellule sono disposte secondo un pattern ghiandolare a formare cavità e cisti irregolari (Kennedy *et al.*, 1998).

Gli adenocarcinomi papillari, fra le specie domestiche, sono comuni solo nella cagna. La dimensione è un criterio di malignità importante. I tumori che si

estendono attraverso l'apertura della borsa ovarica sono maligni e diffondono per impianto alla superficie peritoneale (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998; MacLachlan e Kennedy, 2002; Foster, 2006; Schlafer e Miller, 2007). Le metastasi possono anche verificarsi per via ematica o linfatica (MacLachlan e Kennedy, 2002).

La differenziazione fra adenoma e adenocarcinoma papillare può essere difficile e si basa sulla dimensione, sull'indice mitotico, sull'invasione dello stroma ovarico e sull'estensione alla borsa ovarica e al peritoneo adiacente (Kennedy *et al.*, 1998; MacLachlan e Kennedy, 2002; Klein, 2007).

Il termine carcinoma indifferenziato si usa per indicare un tumore caratterizzato da estesi e disorganizzati foglietti di cellule neoplastiche (MacLachlan e Kennedy, 2002).

Gli adenomi della rete ovarii sono rari e sono stati riscontrati solo nella cagna. L'iperplasia adenomatosa della rete ovarii è comune nelle cagne anziane, ma la distinzione è arbitraria: lesioni proliferative di grosse dimensioni di natura focale sono considerate adenomi, mentre l'iperplasia ha una distribuzione multicentrica. Questi tumori sono costituiti da proiezioni papillari di cellule epiteliali cubiche ciliate che poggiano su uno stroma di scarso tessuto connettivo (Kennedy *et al.*, 1998).

#### **b. Tumori delle cellule germinali**

I tumori delle cellule germinali hanno un'incidenza del 6-12% di tutte le neoplasie ovariche (Klein, 2007).

I tipi istologici sono rappresentati da:

- disgerminomi,
- teratomi,
- carcinomi embrionali.

I disgerminomi sono neoplasie rare, osservate per lo più cagna (Kennedy *et al.*, 1998; Schlafer e Miller, 2007). I disgerminomi sono neoformazioni a crescita espansiva, per lo più monolaterali, che determinano un aumento di volume

sferico od ovoidale della gonade affetta. Al taglio, appaiono di colore bianco-grigio, consistenza dura ed omogenea, sebbene possano essere presenti aree di emorragie e/o necrosi che determinano aree di scolorimento e cisti di variabili dimensioni (MacLachlan e Kennedy, 2002). Il tasso metastatico corrisponde al 10-30% (Klein, 2007; Schlafer e Miller, 2007). Questi tumori, derivanti da cellule germinali indifferenziate, sono altamente cellulari, costituiti da ampi cordoni e tappeti di cellule separati da sottili setti di tessuto connettivo (MacLachlan e Kennedy, 2002). La popolazione cellulare è relativamente uniforme ed è rappresentata principalmente da grosse cellule rotonde con citoplasma chiaro e nuclei centrali con abbondante cromatina granulare e uno o due nucleoli prominenti (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998; Foster, 2006; Klein, 2007; Schlafer e Miller, 2007). Le figure mitotiche sono spesso numerose (Kennedy *et al.*, 1998; Foster, 2006). Inoltre, la divisione incompleta delle cellule tumorali, porta alla formazione di cellule multinucleate giganti (Kennedy *et al.*, 1998). Lo stroma è, in genere, scarso e può essere infiltrato da linfociti (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998).

I teratomi sono rari negli animali domestici, ma più comuni nella cagna (Kennedy *et al.*, 1998; Foster, 2006; Schlafer e Miller, 2007) e si sviluppano in soggetti giovani, generalmente sotto i 6 anni di età (Patnaik e Greenlee, 1987; Klein, 2007). Queste neoplasie sono composte da tessuto anomalo derivato da almeno due foglietti germinali o spesso da tutti e tre e si pensa che derivino da cellule germinali totipotenti sottoposte a differenziazione somatica (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998; Foster, 2006).

La superficie di taglio presenta aree solide e cistiche, che possono contenere materiale sebaceo e peli ed una varietà di tessuti, fra cui osso, cartilagine, denti, tessuto adiposo, tessuto neurale ed epitelio respiratorio (MacLachlan, 1987; MacLachlan e Kennedy, 2002). La variante cistica è spesso definita come cisti dermoide ed è costituita da una cisti delimitata da epitelio che sembra epidermide (Kennedy *et al.*, 1998). La maggior parte dei teratomi è benigna (MacLachlan e Kennedy, 2002; Foster, 2006); esiste però anche la forma maligna, che presenta sia elementi maturi sia elementi indifferenziati che ricordano quelli dell'embrione (Klein, 2007). Le metastasi, composte per lo più

da elementi indifferenziati, colpiscono vari siti addominali, polmone, mediastino anteriore e osso (Klein, 2007).

Il carcinoma embrionale, invece, è composto da cellule embrionali multipotenti che sono in grado di subire un'ulteriore differenziazione producendo un pattern istologico vario (Kennedy *et al.*, 1998).

### **c. Tumori dello stroma gonadico**

Sono tumori che derivano dalle cellule della granulosa, dalle cellule della teca o dai loro derivati luteinizzati (MacLachlan, 1987; MacLachlan e Kennedy, 2002). Dato che la precisa origine di queste strutture non è ben determinata, si preferisce utilizzare il termine "sex cord stromal tumors" che riflette l'incertezza esistente sull'origine embriologica delle cellule della granulosa: cordoni sessuali dell'epitelio mesonefrico o epitelio celomatico (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998; MacLachlan e Kennedy, 2002; Schlafer e Miller, 2007). Questi tumori sono in grado di secernere diverse quantità di ormoni, tra cui progesterone, estrogeni, testosterone ed inibina, che possono influenzare profondamente sia il comportamento riproduttivo sia i tessuti extraovarici dell'animale affetto.

I tumori dello stroma gonadico, in genere, sono tumori di grosse dimensioni, multinodulari o simmetrici, mono o bilaterali, con aree sia solide sia cistiche, con o senza aree di necrosi ed emorragie. Le aree cistiche frequentemente contengono un fluido giallo-rossastro. Alcuni tumori contengono un'unica grossa cavità cistica centrale (MacLachlan e Kennedy, 2002).

I tipi istologici comprendono:

- tumore delle cellule della granulosa,
- tecoma,
- luteoma.

Il tumore delle cellule della granulosa nel cane ha un'incidenza piuttosto controversa infatti, secondo alcuni lavori riportati in letteratura questi tumori non sembrano essere comuni (Allen *et al.*, 1975; Patnaik e Greenlee, 1987; Sivacolundhu *et al.*, 2001; Sforza *et al.*, 2003); in altri, invece, essi vengono

descritti come tumori comuni nell'ovaio della specie canina (Zanghì *et al.*, 2007). Questo tumore colpisce soggetti di età compresa fra 14 mesi e 16 anni (Klein, 2007). Sono stati riportati come tumori ovarici molto comuni nelle cagne intere, anche se ci sono stati alcuni casi riscontrati in cagne sterilizzate, sviluppatasi a carico di residui ovarici rimasti in seguito ad un'escissione incompleta dell'ovaio (Pluhar *et al.*, 1995; Sivacolundhu *et al.*, 2001).

Più comunemente, i tumori delle cellule della granulosa si verificano in soggetti di età media e nell'80% dei casi sono di natura benigna (Norris *et al.*, 1970; Klein, 2007). Nonostante questo, sono stati riscontrati in circa il 20% dei casi tumori delle cellule della granulosa maligni con metastasi a livello di reni, fegato, utero, miocardio (ventricolo sinistro), polmoni e linfonodi prescapolari (Norris *et al.*, 1970; Allen *et al.*, 1975; Patnaik e Greenlee, 1987; Sabocanec *et al.*, 1996; Klein, 2007).

I tumori delle cellule della granulosa di solito sono monolaterali e tendono ad essere di consistenza dura e lobulati, sebbene le cisti siano reperti comuni in sezione di taglio (Klein, 2007; Schlafer e Miller, 2007).

Questi tumori sono composti principalmente da cellule che ricordano le cellule della granulosa, cioè cellule di forma fusata, con nuclei ipercromatici da ovali a sferici, nucleoli distinti e scarso citoplasma eosinofilo; inoltre spesso sono presenti anche cellule della teca interna e fibroblasti (Kennedy *et al.*, 1998). Le mitosi sono rare (Patnaik e Greenlee, 1987).

La disposizione delle cellule neoplastiche può essere molto varia, e, mutuati dalla medicina umana, anche nel cane sono descritti diversi patterns di crescita tumorale: microfollicolare, macrofollicolare, insulare, trabecolare, diffuso, Sertoli-like (Kennedy *et al.*, 1998; Riccardi *et al.*, 2007). Spesso diversi patterns coesistono all'interno dello stesso tumore (Kennedy *et al.*, 1998). Qui di seguito ne viene riportata una veloce descrizione.

Pattern macrofollicolare: caratterizzato da strutture simil-cistiche di varie dimensioni (simili a grossi follicoli di Graaf) circondate da cellule della granulosa disposte su più strati (Patnaik e Greenlee, 1987) ;

Pattern microfollicolare: spesso associato alla presenza di corpi di Call Exner, aggregati radiali di cellule tumorali ben differenziate disposte a rosetta intorno ad

un deposito di materiale proteinaceo eosinofilo (Norris *et al.*, 1969; Kennedy *et al.*, 1998);

Pattern trabecolare ed insulare: caratterizzato da cellule neoplastiche ben differenziate organizzate, rispettivamente, in cordoni e gruppi/isole di diverse dimensioni;

Pattern giriforme: le singole cellule della granulosa si dispongono in file e cordoni che a loro volta assumono un andamento a raggiera;

Pattern tubulare: composto da veri e propri tubuli dotati di lume, simile a quello dei tumori delle cellule del Sertoli del testicolo;

Pattern pseudotubulare e Sertoli-like: simile al precedente, con la differenza che i lumi non sono otticamente vuoti ma occupati dal lungo e chiaro citoplasma delle cellule sertoliformi. Quando, all'interno di una neoplasia, le aree pseudotubulari sono l'elemento predominante, esse vengono considerate a parte come variante femminile del Tumore delle cellule del Sertoli (Scully, 1968; Scully, 1999). Le cellule tumorali in questa variante sono di forma fusata e ricordano quelle dei tumori testicolari, da cui la definizione di pattern Sertoli-like (MacLachlan, 1987; MacLachlan e Kennedy, 2002), nel quale gli ammassi di cellule della granulosa sono separati da setti di tessuto connettivo (Norris *et al.*, 1970; MacLachlan, 1987; MacLachlan e Kennedy, 2002);

Pattern diffuso: caratterizzato dalla presenza di un tappeto di cellule monomorfe, uniformi, che non si organizzano a formare strutture con una morfologia precisa.

Pattern sarcomatoide: caratterizzato da un aspetto decisamente solido, composto da cellule della granulosa aventi forma fusata e strettamente addossate le une alle altre.

Anche se non tutti i tumori della granulosa sono ormonalmente attivi/ormono-secerenti, la maggior parte di essi produce estradiolo, progesterone e inibina  $\alpha$  (MacLachlan, 1987; Kennedy *et al.*, 1998; MacLachlan e Kennedy, 2002; Marino *et al.*, 2003a; Foster, 2006; Akihara *et al.*, 2007; Klein, 2007; Schlafer e Miller, 2007). A seconda della produzione ormonale, il tumore può indurre estro persistente, aumento di volume della vulva con scolo sieroemorragico e alopecia. Altri effetti comprendono il complesso iperplasia endometriale cistica-

piometra e l'atrofia inibina-dipendente dell'ovaio controlaterale (MacLachlan e Kennedy, 2002; Schlafer e Miller, 2007). E' stata anche segnalata, nel cane, la metaplasia squamosa dell'endometrio in un caso di adenomiosinosi polipoide endometriale associata a piometra e tumore delle cellule della granulosa (Zanghì *et al.*, 2007).

Il tecoma è un tumore di origine stromale costituito da cellule che assomigliano alle cellule della teca interna (Kennedy *et al.*, 1998). Le cellule neoplastiche di forma ovale o fusata (Kennedy *et al.*, 1998) presentano nuclei allungati e citoplasma vacuolizzato contenente lipidi che sono indicativi della produzione di ormoni steroidei (MacLachlan e Kennedy, 2002). Il tumore è composto da cellule disposte in tappeti o in fasci intrecciati, ma può contenere variabili quantità di fibroblasti (Kennedy *et al.*, 1998). Generalmente i tecomi sono tumori di natura benigna e a crescita espansiva (Klein, 2007).

I tumori delle cellule interstiziali (luteomi) sono tumori rari, considerati benigni (Kennedy *et al.*, 1998; Klein, 2007). Essi sono composti da grosse cellule rotonde o poliedriche che ricordano le cellule del Leydig, le cellule luteali o le cellule della corticale del surrene (Kennedy *et al.*, 1998). Queste cellule neoplastiche, caratterizzate da abbondante citoplasma eosinofilo granulare che contiene vacuoli lipidici, sono organizzate in lobuli separati da uno stroma di tessuto connettivo ben vascolarizzato (MacLachlan e Kennedy, 2002).

## **HBME-1**

L'HBME-1 (Hector Battifora Mesothelial Epitope-1) è un anticorpo monoclonale ottenuto da una sospensione di cellule mesoteliali umane prelevate da un paziente con mesotelioma epiteliale maligno (Ordóñez e Nelson, 1998). Si sostiene che questo anticorpo reagisca con un antigene presente sulla superficie dei microvilli delle cellule mesoteliali, ma, nonostante questo, la natura dell'antigene rimane a tutt'oggi sconosciuta (Miettinen e Kovatich, 1995; Ordóñez e Nelson, 1998).

La positività all'HBME-1 risulta evidente sottoforma di 2 patterns: pattern membranario spesso, detto "brush borders-like" (Riera *et al.*, 1997), tipico delle cellule mesoteliali, e pattern misto, formato cioè da una marcatura di tipo membranario sottile associata ad una di tipo citoplasmatico, di maggior riscontro nei carcinomi (Renshaw *et al.*, 1995; Saveria *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1997; Ordóñez e Nelson, 1998).

Negli anni '90, in medicina umana, vennero condotti numerosissimi studi riguardanti la reattività dell'HBME-1, questo per meglio testarne la sensibilità e la specificità. Uno dei primi studi condotti è quello di Miettinen e Kovatich (1995), in cui viene valutata la reattività dell'anticorpo HBME-1 su tessuti umani normali e patologici. Venne riscontrata una forte positività nelle cellule mesoteliali della pleura e del peritoneo e nelle cellule dell'epitelio bronchiale ed una positività variabile, invece, nelle cellule mioepiteliali della mammella e nelle cellule della cartilagine bronchiale, epifisaria ed articolare. La positività della cartilagine, in realtà, è un'eccezione in quanto le cellule non epiteliali in genere sono negative; ciò fa ipotizzare che la positività osservata sia legata a componenti di matrice contenenti acido ialuronico o condroitin solfato notoriamente presenti sia nelle cellule mesoteliali sia nella cartilagine. Negativi, invece, risultarono l'epitelio gastrointestinale, l'epitelio del lume della mammella, il tessuto connettivo, la muscolatura liscia uterina e gastrointestinale, la muscolatura scheletrica e il tessuto linfoide. In questo lavoro, vennero presi in considerazione anche 540 tumori di diversa origine, sia maligni che benigni: la maggior reattività fu osservata nei mesoteliomi maligni. Infatti, i mesoteliomi ben differenziati (25 su 29) mostrarono una forte reattività membranosa e una meno marcata reattività

citoplasmatica, mentre quelli scarsamente differenziati (4 su 29) risultarono negativi forse per la mancanza dei microvilli dell'epitelio superficiale a livello dei quali reagisce l'HBME-1. Nel corso degli anni, altri autori condussero studi simili (Renshaw *et al.*, 1995; Attanoos *et al.*, 1996; Saveria *et al.*, 1996; Bateman *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1997; Ordóñez e Nelson, 1998; Yaziji *et al.*, 2006), e l'HBME-1 venne definito un anticorpo sensibile per effettuare diagnosi di lesioni delle cellule mesoteliali (Renshaw *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1997; Yaziji *et al.*, 2006).

Si ipotizzò perciò che potesse essere un marker utile nella diagnosi differenziale fra mesotelioma ed adenocarcinoma metastatizzante alla pleura. Vennero così effettuati vari lavori che analizzavano mesoteliomi maligni, carcinomi polmonari e carcinomi metastatizzati al polmone o alla pleura (Attanoos *et al.*, 1996; Bateman *et al.*, 1997), ai quali poi si aggiunsero ulteriori studi che indagavano la reattività all'HBME-1 anche in carcinomi di altra origine (Miettinen e Kovatich, 1995; Renshaw *et al.*, 1995; Saveria *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1997; Ordóñez e Nelson, 1998; Yaziji *et al.*, 2006; Boutross-Tadross *et al.*, 2007). Viene di seguito riportato un veloce elenco dei tumori maligni testati e i risultati derivanti dalla sperimentazione condotta.

- Mammella: la maggior parte dei carcinomi mammari risultò negativa all'HBME-1 e quei pochi casi positivi presentarono un pattern sottile membranario e/o citoplasmatico (Miettinen e Kovatich, 1995; Renshaw *et al.*, 1995; Saveria *et al.*, 1996; Riera *et al.*, 1997; Yaziji *et al.*, 2006);
- Apparato gastroenterico: vennero testati con HBME-1 tumori sviluppatisi a livello gastrico, colon-rettale, pancreatico ed epatico che risultarono nella gran parte dei casi negativi, ad eccezione dei colangiocarcinomi che risultarono positivi (Miettinen e Kovatich, 1995; Saveria *et al.*, 1996; Riera *et al.*, 1997; Yaziji *et al.*, 2006);
- Ren: quasi tutti i carcinomi renali testati non esprimevano l'HBME-1, tranne pochi casi nei quali si evidenziò una positività di grado variabile da debole a moderata (Miettinen e Kovatich, 1995; Saveria *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1997);

- Tiroide: nello studio di Miettinen e Kovatich del 1995, vennero valutati sia adenomi sia carcinomi tiroidei che risultarono rispettivamente negativi e positivi.
- Ovaio: fra i tumori ovarici, in tutti gli studi in cui sono stati considerati, si osserva una positività del 100% da parte dei cistadenomi e cistadenocarcinomi sierosi, e una negatività nella maggior parte dei cistadenomi e cistadenocarcinomi mucinosi (Miettinen e Kovatich, 1995; Kennedy *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1997; Ordóñez e Nelson, 1998; Yaziji *et al.*, 2006). Inoltre in uno studio di Boutross-Tadross del 2007 nel quale vennero presi in considerazione 13 casi di struma ovarii, una rara forma di teratoma ovarico caratterizzato da una predominante componente tiroidea, ben 8/13 neoplasie risultarono positive per HBME-1. Tali neoplasie mostravano un pattern istologico compatibile con carcinoma tiroideo papillare.

La maggior parte degli autori sembra concorde nel definire l'HBME-1 un marker dotato di buona sensibilità, ma di bassa specificità e quindi poco utile nella diagnosi differenziale fra mesoteliomi ed adenocarcinomi polmonari (Miettinen e Kovatich, 1995; Attanoos *et al.*, 1996; Bateman *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1997; Ordóñez e Nelson, 1998; Yaziji *et al.*, 2006). Tuttavia, dagli studi condotti, emerse l'importanza di questo marker nel riconoscimento di alcuni carcinomi, soprattutto di quelli ovarici.

Nello specifico, infatti, a fronte della migliore sensibilità, ma soprattutto della maggiore specificità, alcuni anticorpi sono ritenuti migliori dell'HBME-1 per quanto concerne la diagnosi differenziale fra mesoteliomi ed adenocarcinomi. Per esempio, la trombomodulina viene considerata da Kennedy e collaboratori (1997) un marker più utile, caratterizzato da una sensibilità dell' 86%. Yaziji e collaboratori (2006) sostengono, inoltre che la calretina sia il marker d'elezione per l'identificazione dei mesoteliomi in quanto è dotata di una più alta sensibilità (95%) ed una relativamente alta specificità (87%) rispetto all'HBME-1 (sensibilità=84%, specificità=45%).

Altri autori, invece, sostengono che, sebbene l'HBME-1 marchi sia i mesoteliomi che gli adenocarcinomi, esso possa essere comunque un utile strumento diagnostico, in quanto la positività rilevata nei due tipi di tumori è differente. I mesoteliomi, infatti, sono caratterizzati da uno spesso pattern membranario, dovuto alla positività del brush border che caratterizza queste cellule, mentre gli adenocarcinomi sono caratterizzati da un sottile pattern membranario associato ad una diffusa positività citoplasmatica (Renshaw *et al.*, 1995; Savera *et al.*, 1996; Dahlstrom *et al.*, 2001). Va però ricordato che, spesso, tale distinzione può essere di difficile interpretazione (Abutaily *et al.*, 2002).

In definitiva, nonostante le opinioni divergenti espresse, gli autori convengono sul fatto che l'HBME-1 sia comunque un marker valido da utilizzare in diagnostica, soprattutto se inserito in un pannello anticorpale.

Infine, in un lavoro del 1997, (Riera *et al.*, 1997), viene effettuata la rivalutazione di un pannello anticorpale utilizzato per la diagnosi di mesotelioma dopo aver eseguito uno smascheramento termo-indotto. Per quanto riguarda l'HBME-1, con lo smascheramento, si osserva un minimo aumento della sensibilità senza influenzare la specificità. I risultati infatti, dimostrano come, su più di 200 campioni analizzati, la differenza di positività tra i casi trattati con lo smascheramento e non trattati, sia di poche decine di casi.

In medicina veterinaria, l'HBME-1 è stato utilizzato solo in uno studio (Bacci *et al.*, 2006) che lo includeva in un pannello anticorpale per la diagnosi di mesoteliomi felini. Sei su 10 mesoteliomi risultarono positivi all' HBME-1 mostrando un pattern membranario, e pertanto è stato confermato, almeno nel gatto, il suo valore come marker mesoteliale. Dati relativi alla sua reattività nella specie canina sono completamente assenti.

## **PRINCIPALI MARKERS IMMUNOISTOCHIMICI ESPRESSI NELL'OVAIO NORMALE UMANO**

### **INIBINA $\alpha$**

L'inibina è un ormone glicoproteico composto da due subunità,  $\alpha$  e  $\beta$ , unite da un ponte disulfidico a formare le due isoforme, inibina A e inibina B (De Jong *et al.*, 1990; Hayes *et al.*, 1998; McCluggage, 2001; Luisi *et al.*, 2005) ed è un membro della famiglia di geni del transforming growth factor  $\beta$  (McCluggage, 2001; Schumer e Cannistra, 2003). Nell'ovaio umano, l'espressione del gene dell'inibina è stata dimostrata nelle cellule della granulosa, della teca e del corpo luteo con pattern differenti a seconda della fase del ciclo mestruale (Hayes *et al.*, 1998; Luisi *et al.*, 2005). L'espressione dell'inibina  $\alpha$  sembra relativamente costante durante lo sviluppo follicolare in seguito allo stadio antrale, mentre quella della subunità  $\beta_A$  è maggiore nel corpo luteo e nel follicolo dominante e quella della subunità  $\beta_B$  è più elevata nelle cellule della granulosa dei follicoli antrali nel momento della transizione fra le fasi luteale e follicolare (Hayes *et al.*, 1998). La presenza del peptide inibina, comunque, è essenzialmente ristretta allo strato di cellule della granulosa dei follicoli antrali e preovulatori ed alle cellule luteiniche della granulosa dei corpi lutei attivi, mentre è scarsa o assente a livello delle cellule interstiziali e della teca (Yamamoto *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1992; Luisi *et al.*, 2005). Le subunità di inibina sono state anche riscontrate nel corpo luteo gravidico (Minami *et al.*, 1995; Luisi *et al.*, 2005).

### **FOLLICLOSTATINA**

La follicolostatina viene espressa dalle cellule della granulosa di tutti i follicoli pre-antrali ed antrali non atresici e l'intensità del segnale ottenuto con l'ibridazione in situ è molto marcata. L'intensità, però, diminuisce con l'instaurarsi dell'atresia e, man mano che procede, l'espressione della follicolostatina da parte delle cellule della granulosa svanisce, rimanendo solo a livello delle cellule del cumulo. Nell'ultimo stadio di atresia dei follicoli anche le cellule del cumulo ooforo non la esprimono più (Braw-Tal, 1994). Questo complesso studio dimostra, quindi, che l'espressione dei geni della follicolostatina e delle subunità

$\alpha$  e  $\beta_A$  dell'inibina è sequenziale e specifica per ciascuno stadio dello sviluppo follicolare.

### **FILAMENTI INTERMEDI**

Tra le proteine che formano il citoscheletro cellulare dei vertebrati, il ruolo più interessante è rivestito dai filamenti intermedi, così definiti in quanto possiedono dimensioni intermedie, cioè di circa 10 nm, rispetto alle altre componenti come i microfilamenti (6nm) e i microtubuli (25nm) (Cooper *et al.*, 1985). I filamenti intermedi impiegati come marker nello studio delle patologie ovariche sono le citocheratine e la vimentina.

### **CITOCHERATINE E VIMENTINA**

Le cellule della granulosa dei follicoli primordiali, primari, secondari e terziari risultano essere contemporaneamente positive a vimentina e citocheratine (Czernobilsky *et al.*, 1985; Benjamin *et al.*, 1987). Le citocheratine espresse sono la CK8, la CK18 e la CK19 (Van Niekerk *et al.*, 1993). Con la maturazione dei follicoli, la quantità di vimentina rimane invariata mentre quella di citocheratine tende a diminuire (Czernobilsky *et al.*, 1985). In merito a ciò, però, si hanno pareri discordanti: secondo Benjamin e collaboratori (1987), le cellule della granulosa perdono la capacità di esprimere citocheratine in stadi avanzati mantenendola in fase di luteinizzazione e addirittura nel corpo luteo stesso, mentre secondo Park e Kim (1994) i follicoli perdono precocemente questa capacità esprimendo solo vimentina.

Gli oociti appaiono privi di filamenti intermedi, mentre le cellule della teca e lo stroma ovarico risultano esprimere solo vimentina (Czernobilsky *et al.*, 1985; Benjamin *et al.*, 1987).

L'epitelio di rivestimento, come le cellule della granulosa, esprime vimentina e le CK 8, 18 e 19, ma anche la CK7, una cheratina basica che si trova nell'epitelio ghiandolare di diversi organi come l'endometrio, la ghiandola mammaria e appunto l'epitelio della superficie ovarica (Czernobilsky *et al.*, 1985; Van Niekerk *et al.*, 1991; Van Niekerk *et al.*, 1993; Park e Kim, 1994).

La coespressione di vimentina e citocheratine nelle cellule della granulosa dipende sicuramente dalla loro derivazione embrionaria che è, però, ancora controversa, in quanto alcuni autori sostengono che le cellule della granulosa derivino dall'epitelio celomatico (Czernobilsky *et al.*, 1985; Moore, 1988; Van Niekerk *et al.*, 1991) , ed altri dai tubuli del mesonefro (Wartenberg, 1982) .

### **HBME-1**

L'HBME-1 è stato utilizzato, in un recente studio di medicina umana (Okamoto *et al.*, 2009), insieme ad altri anticorpi, allo scopo di caratterizzare l'epitelio di superficie ovarico. I risultati confermarono nel 100% dei campioni, la positività all'HBME-1 dell'epitelio che riveste la superficie dell'ovaio.

## **PRINCIPALI MARKERS IMMUNOISTOCHIMICI ESPRESSI NEI TUMORI DELLE CELLULE DELLA GRANULOSA E NEI CARCINOMI OVARICI DELL'UOMO**

I tumori dello stroma gonadico possono essere distinti dai tumori epiteliali ovarici e da lesioni metastatiche di altri tumori maligni grazie all'aspetto istologico o, più spesso, dopo un'analisi immunofenotipica (Costa *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 2000; Ciris *et al.*, 2004). Tuttavia, la differenziazione dei tumori dello stroma gonadico da altri tipi di tumori ovarici, come il carcinoma endometriode, il carcinoma ovarico a piccole cellule e il sarcoma dei tessuti molli, può risultare difficile (Roth *et al.*, 1982; Young *et al.*, 1982; Flemming *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2000; Ciris *et al.*, 2004). Inoltre, mentre un tumore delle cellule della granulosa con pattern di crescita microfollicolare viene facilmente diagnosticato in sezioni istologiche di routine, alcune varianti di tale tumore con aspetto diffuso o sarcomatoide vengono spesso interpretate come carcinomi, sarcomi od emangiopericitomi (Flemming *et al.*, 1995; Rishi *et al.*, 1997). Inoltre, la variante diffusa del tumore delle cellule della granulosa può essere confusa con sarcomi stromali dell'endometrio sia primari che metastatici (Young *et al.*, 1984; Young e Scully, 1990; Rishi *et al.*, 1997).

I marker di maggior riscontro nella caratterizzazione immunofenotipica dei tumori ovarici sono l'inibina  $\alpha$ , citocheratine, vimentina, calretina, AMH, EMA, WT1 e CD99 di cui verrà di seguito riportata una breve descrizione.

### **INIBINA $\alpha$**

Di particolare rilievo, nella diagnostica differenziale dei tumori ovarici, risulta essere l'inibina  $\alpha$ , la cui validità è stata testata, sia a livello sierico che su campioni istologici, in vari studi. L'inibina  $\beta$ , al contrario, è di minor valore perchè, sebbene positiva nei tumori gonadostromali dell'ovaio, marca anche la maggior parte degli adenocarcinomi (Zheng *et al.*, 1997; McCluggage, 2001; Ciris *et al.*, 2004).

Numerosi sono i lavori che correlano l'aumento dei livelli sierici di inibina  $\alpha$  in pazienti con vari tumori gonadici, più comunemente con il tumore delle cellule

della granulosa (Lappöhn *et al.*, 1989; De Jong *et al.*, 1990; Healy *et al.*, 1993; Jobling *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 1995; Gurusinghe *et al.*, 1995; Flemming *et al.*, 1996; Boggess *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998; Schumer e Cannistra, 2003), e studi immunoistochimici che dimostrano come l'inibina sia un marker sensibile per i tumori dello stroma gonadico (Flemming *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1997; Hildebrandt *et al.*, 1997; Rishi *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998; Pelkey *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000; Cathro *et al.*, 2005; McCluggage e Young, 2005). Nel 1995 l'inibina  $\alpha$  è stata utilizzata per la prima volta come marker immunoistochimico per differenziare i tumori dello stroma gonadico da altri tumori di aspetto simile (Flemming *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2003). Oggi l'inibina  $\alpha$  è considerato il marker più specifico per la diagnosi dei tumori delle cellule della granulosa (Costa *et al.*, 1997; Hildebrandt *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1997; Kommoss *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003; Ciriş *et al.*, 2004; Cathro *et al.*, 2005).

Secondo McCluggage (2001) e Zheng e collaboratori (2003), i tumori delle cellule della granulosa mostrano una positività di solito forte e diffusa nelle aree ben differenziate, mentre è debole e focale nelle aree scarsamente differenziate. Pur concordando con McCluggage e Zheng riguardo l'utilità dell' inibina  $\alpha$  nella diagnostica differenziale tra i tumori dello stroma gonadico, Hildebrandt e collaboratori (1997) e Choi e collaboratori (2000) sostengono, al contrario, che non esiste correlazione fra il tipo istologico del tumore e l'intensità o il pattern determinato dalla reazione immunoistochimica.

Nella maggior parte dei casi, la distribuzione della reazione immunoistochimica risulta di tipo diffuso e la percentuale di cellule tumorali che mostra una positività citoplasmatica varia dal 30% al 100% con una media dell'80% (Flemming *et al.*, 1996; Hildebrandt *et al.*, 1997; Rishi *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1997).

Va però ricordato che la sensibilità e specificità di questo marker non è pari al 100%, infatti le cellule luteinizzate, in un'ampia varietà di tumori ovarici primari o metastatici (Hildebrandt *et al.*, 1997; Rishi *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2003), risultano spesso positive, così come la positività a tale marker è stata riscontrata in un esiguo numero di tumori ovarici epiteliali (Hussong *et al.*, 1997; Pelkey *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998).

## **CITOCHERATINE E VIMENTINA**

Sono stati pubblicati diversi studi sull'espressione dei filamenti intermedi nei tumori delle cellule della granulosa umani con risultati però contraddittori (Young e Scully, 1984; Czernobilsky *et al.*, 1985; Miettinen *et al.*, 1985; Benjamin *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 1994; Park e Kim, 1994).

Alcuni autori hanno dimostrato, nei tumori della granulosa, unicamente l'espressione di vimentina (Miettinen *et al.* 1985; Park e Kim, 1994). In particolare, nel Lavoro di Park e Kim (1994), questa reattività ha una distribuzione, nelle cellule tumorali, di tipo perinucleare.

La maggior parte degli autori, invece, ha dimostrato, da parte di questi tumori, una coespressione di vimentina e citocheratine (McNutt *et al.*, 1985; DeLellis e Kwan, 1988). Caratteristica comune di tali studi è la positività alla vimentina, sempre preponderante e diffusa, mentre i valori riferibili alla positività delle citocheratine variano dal 33% al 70% (Costa *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2003), spesso con espressione di tipo focale (Benjamin *et al.*, 1987).

Per quanto riguarda l'epitelio ovarico neoplastico, le cellule esprimono gli stessi marker dell'epitelio ovarico normale e cioè vimentina, CK7, CK 8, CK18 e CK19 (Czernobilsky *et al.*, 1985; Van Niekerk *et al.*, 1991; Van Niekerk *et al.*, 1993; Park e Kim, 1994). Pertanto in ambito ovarico, la CK7 viene considerata un buon marker per i tumori di derivazione epiteliale (Wauters *et al.*, 1995; Berezowski *et al.*, 1996; Cathro e Stoler, 2002; Vang *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2009) e quindi utilizzata nella diagnosi differenziale tra carcinomi e tumori delle cellule della granulosa (Van Niekerk *et al.*, 1993).

## **CALRETINA**

La calretina, una proteina che lega il calcio primariamente espressa da neuroni nel sistema nervoso centrale e periferico (Cathro *et al.*, 2005), è considerato uno dei principali marker da utilizzare in un pannello di immunoistochimica per la diagnosi di mesotelioma (Doglioni *et al.*, 1996; Ordóñez e Nelson, 1998; Attanoos *et al.*, 2001; Attanoos *et al.*, 2002; Ordóñez, 2003; King *et al.*, 2006). Nello studio di Doglioni e collaboratori (1996) che prendeva in considerazione tumori metastatizzanti alla pleura, venne notata una positività alla calretina nei

tumori delle cellule della granulosa e così vennero pubblicati vari studi sulla possibile utilità di questo marker nella diagnosi dei tumori dello stroma gonadico (Cao *et al.*, 2001; McCluggage, 2001; McCluggage e Maxwell, 2001; Movahedi-Lankarani e Kurman, 2002; Deavers *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2003; Cathro *et al.*, 2005; McCluggage e Young, 2005). Molti di questi lavori compararono i due markers più utilizzati, inibina  $\alpha$  e calretina, per verificarne i dati relativi alla sensibilità e specificità. Nella maggior parte di questi lavori, la calretina risultò essere un marker sensibile (76%) per i tumori dello stroma gonadico (sex cord stromal tumors), ma con una specificità inferiore rispetto a quella dell'inibina  $\alpha$  (Movahedi-Lankarani e Kurman, 2002; Deavers *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2003; Cathro *et al.*, 2005; McCluggage e Young, 2005).

#### **ANTI MULLERIAN HORMONE (AMH)**

L'**AMH** o Mullerian Inhibitory Substance (**MIS**) è recentemente emerso come possibile marker per i tumori dello stroma gonadico, in particolare per quelli delle cellule della granulosa (Matias-Guiu *et al.*, 1998; Schumer e Cannistra, 2003). Nelle donne, l'AMH viene prodotto dalle cellule della granulosa dei follicoli ovarici in via di sviluppo, ed è riscontrabile solo nel primo periodo post-natale e dalla pubertà fino alla menopausa (Tran *et al.*, 1977; Vigier *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1986; Hudson *et al.*, 1990; Josso *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 1990; Münsterberger e Lovell-Badge, 1991; Hirobe *et al.*, 1992; Rey *et al.*, 1996) e mai in consistenti quantità, eccetto che nel caso dei tumori delle cellule della granulosa (Teixeira *et al.*, 2001; Josso *et al.*, 2006).

I livelli di AMH sono elevati in modo ciclico durante tutta la vita riproduttiva e diventano scarsi nel periodo post-menopausa (Schumer e Cannistra, 2003). L'utilità dell'AMH come marker per i tumori delle cellule della granulosa è stato per lo più indagata a livello sierico. Alcuni autori (Rey *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1999) riportano, infatti, livelli di AMH estremamente elevati in pazienti con tumori della granulosa, e livelli estremamente bassi, tali da non essere misurabili, in soggetti in fase di remissione clinica (Rey *et al.*, 1996).

L'unico articolo nel quale viene condotto uno studio di immunostochimica su tumori ovarici utilizzando l'AMH come marker (Rey *et al.*, 2000), ne conferma la

positività da parte dei tumori della granulosa, tanto da essere considerato un buon marker la diagnosi differenziale tra i “sex cord stromal tumors” e altri tumori gonadici.

### **WILMS' TUMOR SUPPRESSOR GENE (WT1)**

Il gene del tumore di Wilms è un gene soppressore tumorale riscontrato a livello del cromosoma 11p13, importante nello sviluppo del sistema urogenitale (Cathro *et al.*, 2005). La sua espressione, però, è stata rilevata anche in vari tumori umani tra cui i mesoteliomi e i tumori non mucinosi dell'epitelio di superficie dell'ovaio (Bruening *et al.*, 1993; Ordóñez, 2000; Shimizu *et al.*, 2000; Goldstein e Uzieblo, 2002). Tuttavia, nello studio di Cathro *et al.* (2005) l'espressione di WT1 non è stata osservata in questi tumori ovarici, ma è stata rilevata in percentuali variabili e contrastanti con altri studi nei carcinomi papillari sierosi e nei carcinomi non mucinosi dell'ovaio (Ordóñez, 2000; Shimizu *et al.*, 2000; Goldstein e Uzieblo, 2002). Sempre nello stesso studio, la maggior parte dei tumori delle cellule della granulosa mostrarono una positività focale variabile da debole a marcata.

### **EPITHELIAL MEMBRANE ANTIGEN (EMA)**

Componente di una famiglia di glicoproteine trans-membrana ad alto peso molecolare (King *et al.*, 2006), l'antigene epiteliale di membrana è un anticorpo assai valido nella diagnosi differenziale tra tumori della cellula della granulosa e carcinomi scarsamente differenziati. Tutti gli studi condotti dimostrano come EMA sia sempre espresso dai tumori epiteliali e mai in quelli della granulosa (Costa *et al.*, 1994; Ordóñez e Nelson, 1998; Hildebrandt *et al.*, 1997; McCluggage, 2001; Schumer e Cannistra, 2003; McCluggage e Young, 2005).

### **CD99**

Il CD99 è ben conosciuto come marker relativamente specifico per il sarcoma di Ewing e il tumore neuroectodermico primario (Ambros *et al.*, 1991; Fellingner *et al.*, 1991; Otis *et al.* 1992; Dehner, 1993; Costa *et al.*, 1994; Perlman *et al.*, 1994; Weidner e Tjoe, 1994).

Esso reagisce inoltre con varie cellule normali, incluse le cellule della granulosa e del Sertoli (Stevenson *et al.*, 1994; Weidner e Tjoe, 1994; Loo *et al.*, 1995).

E' un marker poco usato ma che si è dimostrato utile nella diagnostica differenziale tra tumori della granulosa e carcinomi endometrioidi. Sia nei lavori di Matias-Guiu e collaboratori (1998) che Choi e collaboratori (2000), tutti i tumori della granulosa risultarono positivi, mentre nei carcinomi endometrioidi si registrò totale negatività. Più genericamente, Gordon e collaboratori (1998) dimostrarono la positività in tutti i tumori della granulosa presi in considerazione e l'assenza di reattività da parte dei tumori epiteliali scarsamente sdifferenziati (carcinomi sierosi e mucinosi e carcinomi endometrioidi).

## **PRINCIPALI MARKERS IMMUNOISTOCHEMICI ESPRESSI NELL'OVAIO NORMALE DI CANE E NELLE RELATIVE NEOPLASIE**

Per quanto riguarda la specie canina, in letteratura sono presenti pochi studi inerenti l'aspetto immunoistochimico dell'ovaio normale e delle relative neoplasie.

Marino *et al.* (2003b) hanno condotto uno studio sull'espressione di inibina ed activina nell'ovaio normale di cane. Da tale studio è emerso che le subunità  $\alpha$ ,  $\beta_A$  e  $\beta_B$  di inibina/activina vengono espresse in maniera diversa a seconda della fase del ciclo estrale. Come nell'uomo, le cellule della granulosa dei follicoli in via di sviluppo e le cellule luteiniche rappresentano la principale sede di produzione di inibina ed activina nell'ovaio (Marino *et al.*, 2003b).

A differenza di altri mammiferi, nel cane si osserva l'espressione delle diverse subunità di inibina/activina già nei follicoli pre-antrali (Rokukawa *et al.*, 1986; Knight *et al.*, 1990; Nagamine *et al.*, 1998). Questo fatto suggerisce l'importante ruolo che questi peptidi svolgono come "*local gonadotrophin independent growth factor*" ed è un'ulteriore conferma dell'importante azione che l'inibina  $\alpha$  svolge durante la follicologenesi (Knight e Glister, 2001; Marino *et al.*, 2003b).

L'espressione invece della subunità  $\beta$  nelle cellule della granulosa e negli oociti pre-ovulatori è indicativo del suo coinvolgimento nella maturazione dell'oocita (Izadyar *et al.*, 1998; Marino *et al.*, 2003b).

Nello studio condotto da Espinosa de Los Monteros e collaboratori (1999) su carcinomi felini e canini, si è osservato che nell'ovaio normale l'espressione della CK7 e della CK20 è evidente a livello di rete ovarica ed epitelio superficiale, ma non viene fatto nessun riferimento sull'espressione di tali citocheratine da parte dei follicoli ed in particolare dalle cellule della granulosa.

Per quanto riguarda i tumori ovarici, sono stati riportati solo 3 studi (Marino *et al.*, 2003a; Akihara *et al.*, 2007; Riccardi *et al.*, 2007), nei quali viene ribadita una diffusa positività citoplasmatica delle cellule della granulosa neoplastiche, oltre che alla vimentina e alla pan-citocheratina, specificatamente all'inibina  $\alpha$ . I tumori epiteliali, al contrario, pur essendo anch'essi positivi sia per pan-citocheratina che vimentina, non mostrano mai positività all'inibina  $\alpha$ , bensì ad

altri markers, quali la CK7 (Espinosa de Los Monteros *et al.*, 1999; Akihara *et al.*, 2007; Riccardi *et al.*, 2007).

## **SCOPO DEL LAVORO**

Per quanto rari, i tumori ovarici del cane rappresentano una sfida diagnostica per il patologo veterinario, in quanto, tali neoplasie, pur derivando da tipi cellulari diversi, hanno spesso aspetti morfologici e pattern di crescita paragonabili, caratteristiche che possono facilmente dare adito a confusione e ad errori diagnostici, con risvolti clinici spesso drammatici.

Più precisamente, il tumore delle cellule della granulosa, di per sé benigno, talora condivide aspetti istologici simili a quelli riscontrati nelle neoplasie derivate dall'epitelio di rivestimento dell'ovaio che, al contrario, sono frequentemente maligne e metastatizzanti.

Alla luce della prognosi spesso infausta associata a queste ultime neoplasie, risulta importante giungere ad una corretta diagnosi differenziale tra i due tipi di tumore ovarico. A questo scopo, la tecnica immunohistochimica, utilizzando markers specifici, permette di poter discriminare, con il minimo margine di dubbio, tra le diverse neoplasie.

Date le oggettive difficoltà nella diagnostica differenziale dei tumori ovarici canini, lo scopo del mio lavoro è stato quello di ampliare, al pari della medicina umana, il pannello immunohistochimico delineato da Riccardi *et al* (2007) per i tumori ovarici del cane. A tal fine, ci si è focalizzati sull'impiego di un marker, l'HBME-1, scarsamente utilizzato in medicina veterinaria, ma che riveste un ruolo importante nella diagnostica differenziale umana.

## MATERIALI E METODI

Grazie alla collaborazione di altre due Facoltà di Medicina Veterinaria, Napoli e Sassari, sono stati prelevati, dall'archivio dei pezzi istologici della Sezione di Anatomia Patologica delle varie Facoltà, i blocchetti relativi a 28 tumori ovarici di cane pervenuti tra il 1995 ed il 2009, diagnosticati come 10 tumori delle cellule della granulosa, 17 adenocarcinomi ed 1 adenoma, appartenenti a cani di razze diverse e di età compresa tra 7 e 16 anni.

Sono state inoltre considerate 4 ovaie normali appartenenti a cagne adulte, utilizzate come controllo.

Da ciascun blocchetto sono state prodotte sezioni seriate di 5 micron di spessore. Una di tali sezioni è stata colorata con Ematossilina-Eosina ed è stata destinata all'esame istologico; le altre sezioni sono state invece destinate all'esame immunohistochimico.

Non essendoci, per la specie canina, una classificazione esaustiva di riferimento, per meglio definire la morfologia delle neoplasie esaminate, e in particolare per quelle della granulosa, ci si è avvalsi della classificazione riportata sui bollettini del WHO umano (Scully, 1999). Tale classificazione riporta vari *pattern* di crescita:

- follicolare (macro e microfollicolare)
- trabecolare
- insulare
- giriforme
- pseudotubulare (Sertoli-like)
- diffuso
- sarcomatoide.

Durante l'esame istologico, per tutti i campioni, si è valutato l'indice mitotico mediante la conta delle mitosi presenti in 10 campi a 400 X. Tale valore, diviso per 10, dava l'indice mitotico.

Le diagnosi emesse erano state ottenute mediante esame immunohistochimico sulla base dell'applicazione di un pannello di anticorpi oggetto di una precedente pubblicazione (Riccardi 2007). In particolare la citocheratina 7 era stata impiegata per il riconoscimento dei tumori di derivazione dall'epitelio ovarico

(adenomi – adenocarcinomi) mentre l'inibina  $\alpha$  veniva applicata come marker dei tumori gonadostromali (tumore delle cellule della granulosa).

Per quanto riguarda l'esame immunohistochimico, i test sono stati effettuati tramite il metodo avidina-biotina-perossidasi (ABC) (Hsu *et al.*, 1981), impiegando i seguenti anticorpi:

- Inibina- $\alpha$  (INH $\alpha$ ) (Serotec): diluito 1/40
- HBME-1 (Dako-cytomation): diluito 1/1000.

Per entrambi gli anticorpi è stato effettuato uno smascheramento termindotto (tampone citrato in forno a microonde per 10 minuti a 650 W). Inoltre, per 6 delle 18 neoplasie epiteliali considerate in questa Tesi provenienti dal nostro archivio sono state ottenute ulteriori sezioni per poter effettuare la posa dell'anticorpo diretto contro l'HBME-1 con e senza smascheramento termindotto, per verificare se questo migliorasse effettivamente la reattività dei campioni.

Infine, tutti i vetrini sottoposti ad esame immunohistochimico, una volta controcolorati, sono stati osservati al microscopio e ne sono stati comparati i risultati ottenuti. A questo fine, è stata effettuata una valutazione semiquantitativa delle cellule positive secondo un sistema di + così conformato:

- negativo
- + = <10% di cellule positive;
- ++ dall' 10-30% di cellule positive;
- +++ da 31-60% di cellule positive;
- ++++ da 61-100% di cellule positive.

## **RISULTATI**

Una descrizione riassuntiva dei risultati viene fornita nella Tabella 1 collocata a fine capitolo accanto al materiale iconografico.

### **ESAME ISTOLOGICO**

#### OVAIE NORMALI

Nelle 4 ovaie esaminate, tutte rivestite da epitelio integro, è stata osservata la presenza di numerosi oociti, follicoli a diverso stadio di sviluppo evolutivo e di alcuni corpi lutei, il tutto immerso in uno stroma denso composto da cellule fuse. Non era osservabile nessun reperto patologico.

#### TUMORI OVARICI

Delle 28 neoplasie prese in analisi, 10 si riferivano a tumori della granulosa, 18 erano invece riferibili a tumori epiteliali.

Come esposto nei Materiali e Metodi per la classificazione morfologica delle neoplasie esaminate, e in particolare per quelle della granulosa, ci si è avvalsi di quella riportata nel volume edito dal WHO riguardante i tumori dell'apparato genitale femminile umano (Scully, 1999). Questa classificazione si rifà ai diversi pattern di crescita mostrati dai tumori della granulosa: follicolare (macro e micro), trabecolare, insulare, giriforme, tubulare, diffuso e sarcomatoide e la variante Sertoli-like.

Nei tumori della granulosa del cane da noi esaminati sono stati evidenziati il tipo follicolare (macro e micro), diffuso, trabecolare nonché la variante Sertoli-like. Tali patterns di crescita spesso erano contemporaneamente presenti nello stesso tumore, anche se in aree diverse (Tab.1).

Le cellule neoplastiche, caratterizzate da minimo pleomorfismo cellulare, erano forma da ovale a rotonda, con margini indistinti e scarsa quantità di citoplasma debolmente eosinofilo. I nuclei erano generalmente rotondi/ovalari ed ipercromatici, con cromatina densa e nucleoli non evidenti. Nelle aree di crescita solida, le cellule avevano forma poligonale, margini indistinti, ed erano

caratterizzate da citoplasma abbondante e nuclei da ovali a rotondeggianti, con cromatina marginata. L'indice mitotico era compreso tra 0 e 1.2.

Per quanto invece riguarda i 18 tumori epiteliali, uno era riferibile ad una neoplasia benigna (adenoma), mentre i restanti 17 campioni si riferivano a neoplasie maligne (adenocarcinomi). Il modello di crescita prevalente era quello cistopapillifero. I tumori erano perciò formati da ampie cavità cistiche all'interno delle quali si sviluppavano papille rivestite da cellule cubiche, talora disposte in più file (Fig 1 A). Frammiste a tali strutture cistiche, in alcune neoplasie, erano inoltre presenti aree a crescita solida, in cui le cellule erano strettamente contrapposte le une alle altre (Fig.1 B). Le cellule neoplastiche erano raramente ciliate, caratterizzate da confini cellulari indistinti, medio rapporto n/c, moderata quantità di citoplasma eosinofilo, e nuclei in posizione basale, con cromatina finemente granulosa e con 1 o 2 nucleoli evidenti. Le cellule mostravano moderati caratteri di anisocitosi ed anisocariosi, mentre le figure mitotiche variavano da 0 a 1 per campo (400X).

Quattro neoplasie su 18 erano caratterizzate da aree multifocali di crescita solida, nelle quali le cellule erano disposte in uno strato compatto, separate da un sottile stroma fibrovascolare. In un solo caso la crescita solida era il modello predominante. Generalmente le neoplasie maligne, indipendentemente dal pattern di crescita osservato erano caratterizzate da estese aree di necrosi ed emorragie ed invasione stromale (Fig.1 C).

## **ESAME IMMUNOISTOCIMICO**

### OVAIE NORMALI

La reattività immunoistochimica per HBME-1 si limitava all'epitelio superficiale ovarico. In particolare, la positività era sempre ben localizzata alla porzione apicale della cellula. Non si riscontrava presenza di segnale di fondo (Fig.1 D).

Le cellule della granulosa, i follicoli (primordiali, primari, secondari e terziari), le cellule della corona radiata e lo stroma erano costantemente negativi per HBME-1.

Le cellule della granulosa erano invece diffusamente positive per INH $\alpha$ .

I corpi lutei erano negativi per entrambi i markers.

## TUMORI OVARICI

### **Tumori della granulosa**

I 10 tumori esaminati risultavano negativi per HBME-1, ma erano marcatamente e diffusamente positivi per INH $\alpha$ .

Per quanto riguarda l'HBME-1, il segnale positivo era esclusivamente limitato alle cellule dell'epitelio di rivestimento. Tale positività fungeva da controllo interno, ed era sempre riscontrabile, con intensità variabile, in tutti i campioni analizzati.

La percentuale di cellule neoplastiche positive per INH $\alpha$  era variabile da tumore a tumore, con un range variabile da meno del 10% al 60-100%.

### **Tumori epiteliali**

Tutti i campioni inclusi nello studio erano negativi per INH $\alpha$ . 17/18 erano invece positivi per HBME-1 indipendentemente dal pattern di crescita e dal comportamento biologico. La positività immunostochimica si riscontrava a carico della porzione apicale delle cellule neoplastiche che delineavano il lume delle numerose strutture cistiche, papillari o tubulari presenti nelle neoplasie (Fig. 1 E). La percentuale di cellule positive marcate variava, a seconda dei campioni, da meno del 5% al 60-100%. Spesso si osservava la presenza di cellule positive nell'immediata vicinanza di cellule negative (Fig. 1 F). Le aree in cui le neoplasie mostravano crescita solida, erano costantemente negative per HBME-1.

La prova immunostochimica effettuata con smascheramento termoindotto, si è rivelata più attendibile in quanto, in 2 casi, dopo smascheramento, si è evidenziato un maggior numero di cellule marcate (casi n. 12 e 13, Tab. 1).

**Tab. 1. Risultati istologici ed immunohistochimici in 28 neoplasie ovariche canine**

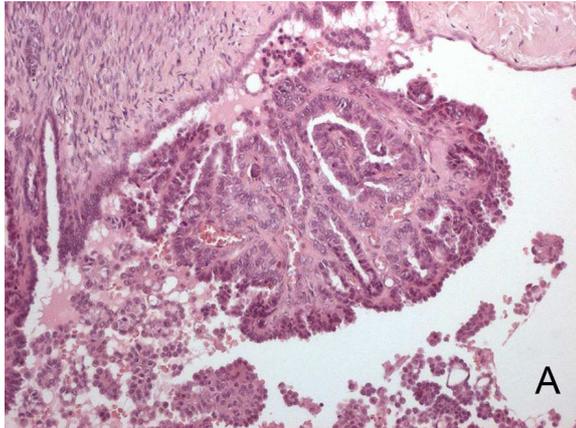
Caso no.	Pattern di crescita	HBME-1 NS	HBME-1 S	INH $\alpha$	Diagnosi
1	Trabecolare/diffuso/ microfollicolare	-	-	+	TCG
2	Microfollicolare/diffuso/ Sertoli-like	-	-	+	TCG
3	Macrofollicolare	-	-	++++	TCG
4	Microfollicolare/ Sertoli-like	-	-	+	TCG
5	Diffuso/ microfollicolare	-	-	+	TCG
6	Diffuso/ Sertoli-like/ Microfollicolare	-	-	+++	TCG
7	Macrofollicular/ Sertoli- like	-	-	++	TCG
8	Follicolare/diffuso	-	-	++++	TCG
9	Macrofollicolare/ microfollicolare	/	-	++	TCG
10	Microfollicolare/ trabecolare	/	-	++++	TCG
11	Diffuso/papillare	++	++	-	A
12	Tubulopapillare/ cistico	++	+++	-	AC
13	Diffuso/ cistico papillare	-	+	-	AC
14	Tubulare/ papillare/cistico	+	+	-	AC
15	Cistico-papillare	+	+	-	AC
16	Diffuso/ solido	-	-	-	AC
17	Cistico- papillare/ diffuso	/	++	-	AC

Caso no.	Pattern di crescita	HBME-1 NS	HBME-1 S	INH $\alpha$	Diagnosi
18	Cistico, papillare	/	+++	-	AC
19	Cistico, papillare	/	+++	-	AC
20	Cistico, papillare	/	++++	-	AC
21	Cistico, papillare/ diffuso	/	+++	-	AC
22	Cistico, papillare	/	+	-	AC
23	Cistico, papillare	/	+	-	AC
24	Cistico, papillare	/	+++	-	AC
25	Cistico, papillare	/	+	-	AC
26	Cistico, papillare	/	++++	-	AC
27	Cistico, papillare	/	++	-	AC
28	Cistico, papillare	/	++++	-	AC

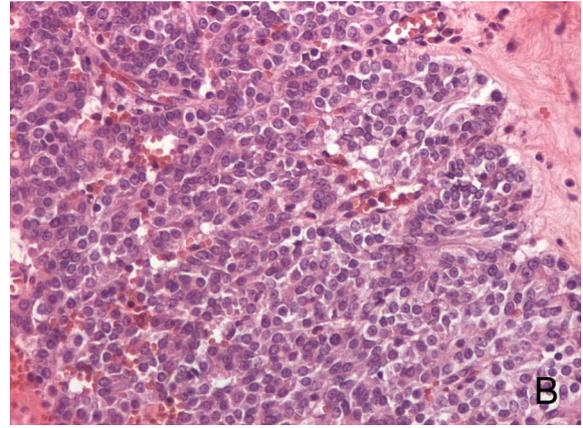
**NS** = no smascheramento antigenico; **S** = smascheramento antigenico; **INH $\alpha$**  = Inibina- $\alpha$ ; **TCG** = tumore delle cellule della granulosa; **AC** = adenocarcinoma; **A** = adenoma; / = non effettuato.

Scoring:

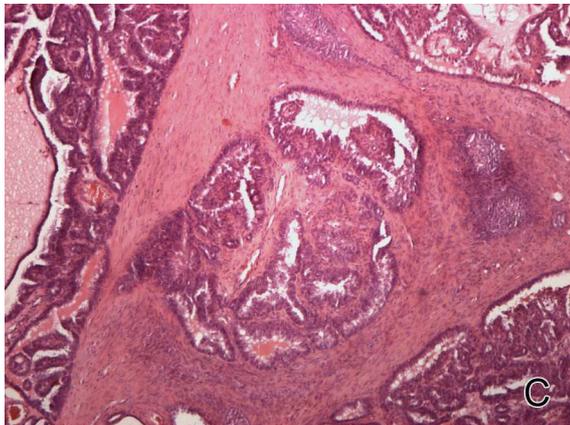
- negativo; + = <10% di cellule positive; ++ dall' 10-30% di cellule positive; +++ da 31-60% di cellule positive; ++++ da 61-100% di cellule positive.



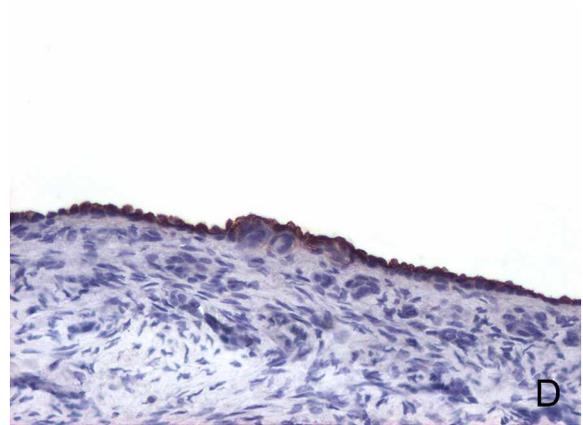
**Fig. 1 A.** Adenocarcinoma ovarico. La neoplasia è formata da ampie cavità cistiche nelle quali sono present strutture papillari (Pattern cistopapillifero). EE, 100x



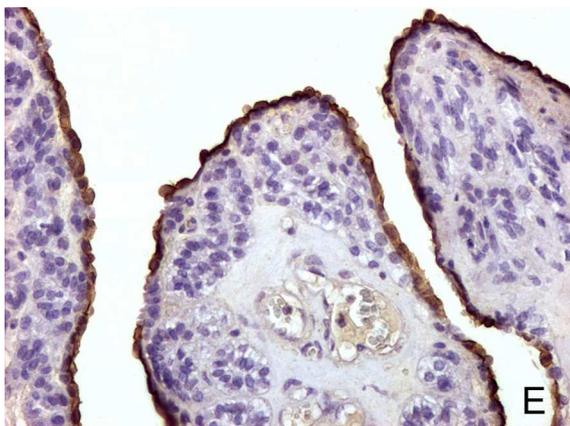
**Fig. 1 B.** Adenocarcinoma ovarico. La neoplasia è formata da uno strato compatto di cellule (Pattern solido/diffuso). EE, 100x



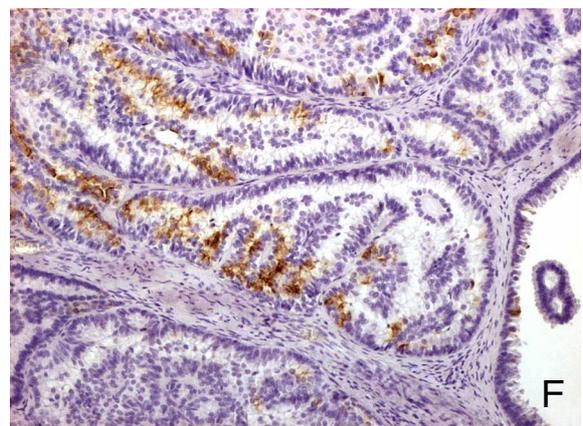
**Fig. 1 C.** Adenocarcinoma ovarico. Invasione stromale. EE, 100x



**Fig.1 D.** Ovaio normale. Le cellule epiteliali di rivestimento mostrano una diffusa positività per HBME-1, 400x



**Fig.1 E.** Adenocarcinoma ovarico. Le cellule che rivestono le strutture papillari mostrano una diffusa positività per HBME-1, 400x



**Fig.1 F.** Adenocarcinoma ovarico. Le cellule positive per HBME-1 coesistono nell'immediata vicinanza di cellule negative. 100x

## DISCUSSIONE

Il tumore delle cellule della granulosa è una neoplasia ovarica relativamente poco frequente tanto nell'uomo quanto nel cane (Bonadonna, 1999; Morrison, 2002).

Inoltre, il suo comportamento biologico è spesso incerto, essendo nell'uomo rare le forme maligne, ma frequenti le recidive, anche a diversi anni di distanza dalla prima escissione (Bonadonna, 1999).

Nel cane solo il 20% dei casi mostra aspetti di malignità e la metastatizzazione, pur osservabile, non è molto frequente (Morris, 2003). Non vi sono dati attendibili circa recidive.

Il tumore delle cellule della granulosa, tuttavia, riveste particolare importanza, in quanto talora condivide aspetti istologici simili a quelli riscontrati nelle neoplasie derivate dall'epitelio di rivestimento dell'ovaio che, al contrario, sono frequentemente maligne e metastatizzanti (Kennedy *et al.*, 1998; Scully, 1999).

Alla luce della prognosi spesso infausta associata a queste ultime neoplasie, risulta importante giungere ad una corretta diagnosi differenziale tra i due tipi di tumore ovarico. A questo scopo è di valido aiuto la tecnica immunocitochimica con l'impiego di markers specifici per discriminare, con il minimo margine di dubbio, tra le diverse neoplasie.

In medicina umana, nell'ultimo decennio, sono stati effettuati diversi studi sull'ovaio normale e neoplastico per cercare di individuare un pannello di anticorpi da utilizzare nella diagnosi immunocitochimica di routine dei tumori ovarici stessi (Czernobilsky *et al.*, 1985; Zheng *et al.*, 2003; McCluggage e Young, 2005).

Da tali studi è emerso che un pannello anticorpale discriminante per la diagnosi dei tumori ovarici dovrebbe contenere INH $\alpha$  e citocheratina 7, la prima per il riconoscimento delle cellule della granulosa normali e neoplastiche, la seconda per il riconoscimento dell'epitelio ovarico.

A questo pannello, in medicina umana, si aggiungono anche altri markers, tra i quali figura l'HBME-1, sempre per il riconoscimento dell'epitelio ovarico.

Per quanto concerne la medicina veterinaria, pochissimi sono i lavori che indagano l'espressione immunocitochimica dei tumori ovarici di cane (Marino *et*

*al.*, 2003a; Akihara *et al.*, 2007; Riccardi *et al.*, 2007), e dati ancora più esigui riguardano il profilo immunostochimico dell'ovaio normale (Marino *et al.*, 2003b; Riccardi *et al.*, 2007).

In una precedente pubblicazione (Riccardi *et al.*, 2007) è stato dimostrato come, al pari della medicina umana, anche in medicina veterinaria, un pannello immunostochimico comprendente INH $\alpha$  e CK7 possa essere di grande utilità nella diagnosi differenziale tra tumori della granulosa e carcinomi ovarici. Questo soprattutto per i tumori delle cellule della granulosa a crescita solida e diffusa che possono essere confusi, se valutati dal solo punto di vista morfologico, con tumori di origine epiteliale di tipo maligno.

Con la presente Tesi, si è voluto ampliare il pannello anticorpale già testato per poter aggiungere, al pari della medicina umana, un marker importante nella diagnosi differenziale dei tumori ovarici.

Pertanto, sono stati inclusi nel nostro lavoro 4 ovaie normali, 10 tumori delle cellule della granulosa e 18 tumori ovarici epiteliali, sia benigni che maligni.

Tutti i campioni sono stati analizzati dal punto di vista istologico ed immunostochimico avvalendosi, in questo caso, degli anticorpi monoclonali anti INH $\alpha$  e HBME-1. In particolare, per quest'ultimo, è stato verificato se lo smascheramento termico potesse influire in maniera positiva sulla reattività dei nostri campioni e sulla sensibilità/specificità dell'anticorpo in esame.

I risultati immunostochimici confermano la buona specificità dell'anticorpo che, su tutte le ovaie normali considerate, ha mostrato di marcare la parte superficiale dell'epitelio di rivestimento, al pari di quanto riscontrato in medicina umana (Okamoto *et al.*, 2009).

La positività, inoltre, era sempre ben localizzata e non si riscontrava presenza di segnale di fondo. Le prove con e senza smascheramento, nelle ovaie normali, hanno dato risultati sovrapponibili con buona marcatura in entrambi casi.

Per il cane, così come per l'uomo, si può, pertanto, ritenere l'HBME-1, un buon marker dell'epitelio ovarico superficiale.

Per quanto riguarda le neoplasie, la totalità dei tumori della granulosa risultava costantemente negativa al marker utilizzato, mentre il normale epitelio di rivestimento, che ci faceva da controllo interno, risultava marcato sia nelle prove

con smascheramento che in quelle senza. Al contrario, i tumori erano sempre marcatamente positivi per INH $\alpha$ .

Per quanto riguarda i tumori epiteliali, 17/18 (94.44%) campioni erano positivi per HBME-1. La percentuale di cellule positive marcate era variabile, e si osservava solo dove le cellule neoplastiche erano disposte in monostrato a rivestire strutture papillari o tubulari/cistiche. Il pattern immunoistochimico osservato corrisponde a quello che in medicina umana viene definito “*thick membrane*”, descritto in molti casi di mesotelioma e tumori ovarici (Riera *et al.*, 1997; Dahlstrom *et al.*, 2001).

Lo smascheramento termoindotto, inoltre, ha migliorato la reattività dei campioni. Infatti, in due casi, la percentuale di cellule positive è aumentata, e un caso, prima negativo, ha mostrato, dopo smascheramento, un numero di cellule positive che, seppur esiguo, consentiva di formulare una diagnosi. Questi aspetti possono essere imputabili alla prolungata fissazione cui generalmente vanno incontro i campioni prelevati in corso di necropsia o al fatto che, spesso, le masse giungono ai laboratori di istologia non sezionate, e ciò comporta una non ottimale fissazione delle porzioni centrali delle neoplasie che può compromettere la reattività del campione. Tale reattività viene spesso ristabilita da tecniche di smascheramento antigenico a caldo che, tuttavia, non sempre hanno successo. Un caso di adenocarcinoma, è risultato negativo ad HBME-1 (caso 16). Il tumore era caratterizzato da crescita solida, ed era risultato precedentemente positivo per CK7 (Riccardi *et al.*, 2007). Inoltre, anche altre aree solide presenti in tumori epiteliali altresì positivi per HBME-1, risultavano sempre negative. Questo dato induce a pensare che l'antigene riconosciuto da HBME-1 sia piuttosto delicato o che subisca, nelle forme tumorali o durante la processazione, un cambio nella conformazione strutturale che impedisce all'anticorpo, monoclonale e pertanto altamente selettivo, di legarsi al determinante antigenico in questione. Non solo, tale antigene, la cui natura è tutt'oggi sconosciuta, sembra espresso solo quando le cellule delimitano un lume o si affacciano su uno spazio cistico o, in ogni caso, si trovano in superficie di strutture papillari. In questi casi l'orletto a spazzola, caratteristica peculiare di questo epitelio, altamente specializzato e

riconosciuto da HBME-1, torna ad essere di nuovo presente. Questo giustifica il risultato osservato nell'unico caso di neoplasia epiteliale negativa per HBME-1: un adenocarcinoma con pattern solido (caso 3). Queste osservazioni inducono a considerare l'HBME-1 un buon marker per il riconoscimento delle neoplasie ovariche epiteliali: non abbiamo mai, infatti, riscontrato alcuna positività nei tumori della granulosa, anche se caratterizzati da un pattern di crescita che avrebbe potuto far nascere dubbi sulla loro classificazione.

Tuttavia, dato il limitato numero di cellule marcate in alcuni campioni e la totale negatività di un adenocarcinoma, HBME-1 merita di essere inserito in un pannello anticorpale che, però, comprenda comunque la CK7, per evitare di incorrere in falsi negativi. Inoltre, per questo tipo di tumori, come già osservato (Riccardi *et al.*, 2007), è opportuno sezionare i campioni prima di fissarli e al momento del trimming considerare più campioni di una stessa neoplasia, da sottoporre poi ad indagini immunoistochimica, al fine di non incorrere in aree negative o necrotiche.

La positività ad HBME-1 era indipendente dal comportamento biologico dei tumori epiteliali, infatti sia l'unico adenoma presente tra i nostri campioni, così come i carcinomi ovarici considerati, sono risultati positivi con la stessa variabilità. Tali riscontri concordano con quanto riportato in medicina umana (Miettinen e Kovatich, 1995). In futuro sarebbe interessante indagare, nel corso di studi più complessi che considerino un maggior numero di campioni e un adeguato follow up dei soggetti, se tale dato rimanga costante.

Concludendo, dalle osservazioni da noi condotte su neoplasie ovariche epiteliali e tumori della granulosa, il marker HBME-1, mai testato su tessuti canini, sembra essere un buon discriminante nella diagnosi differenziale tra questi due tipi di neoplasia. Per concludere, al fine di ottenere maggiore sensibilità, consigliamo, oltre al prelievo di più pezzi della stessa neoplasia, uno smascheramento termoindotto prima della posa dell'anticorpo.

## REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

Abutaily AS, Addis BJ, Roche WR. Immunohistochemistry in the distinction between malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma: a critical evaluation of new antibodies. *J Clin Pathol*, 55: 662-668, 2002.

Adayener C, Akyol I, Sen B, Ates F, Haholu A, Soydan H, Karagoz B. Sertoli cell tumor of the testis: a case with late metastasis. *Int Urol Nephrol*, 40: 1005-1008, 2008.

Aguggini G, Beghelli V, Giulio LF. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. UTET, Torino, 1992.

Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasako K, Komine M, Hirayama K, Kagawa Y, Omachi T, Matsuda K, Okamoto M, Kadosawa T, Taniyama H. Immunohistochemical evaluation of canine ovarian tumors. *J Vet Med Sci*, 69: 703-708, 2007.

Al Attar L, Noël K, Dutertre M, Belville C, Forest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell Anti-Müllerian Hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest*, 100: 1335-1343, 1997.

Allen HL e Franklin GA. Malignant granulosa cell tumor in a bitch. *J Am Vet Med Assoc*, 166: 447-448, 1975.

Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer*, 67: 1886-1893, 1991.

Anderson RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly S. Expression and localization of inhibin/activin  $\beta$ A and  $\beta$ B and the activin type II and inhibin  $\beta$ -glycan receptors in the developing human testis. *Reproduction*, 123: 779-788, 2002.

Arthur GH, Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. *Ostetricia e Riproduzione Veterinaria*. Giraldi Editore, Bologna, 1991.

Atassanova NN, Walker M, McKinnell C, Fischer JS, Sharpe RM. Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol*, 184: 107-117, 2005.

Attanoos RL, Goddard H, Gibbs AR. Mesothelioma-binding antibodies: thrombomodulin, OV 632 and HBME-1 and their use in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Histopathology*, 29: 209-215, 1996.

Attanoos RL, Webb R, Dojcinov SD, Gibbs AR. Malignant epithelioid mesothelioma: anti-mesothelial marker expression correlates with histological pattern. *Histopathology*, 39: 584-588, 2001.

Attanoos RL, Webb R, Dojcinov SD, Gibbs AR. Value of mesothelial and epithelial antibodies in distinguishing diffuse peritoneal mesothelioma in females from serous papillary carcinoma of the ovary and peritoneum. *Histopathology*, 40: 237-244, 2002.

Aümüller G, Schulze C, Viebahn C. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech*, 20: 50-72, 1992.

Aümüller G, Steinbrück M, Krause W, Wagner HJ. Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. *Anat Embryol*, 178: 129-136, 1988.

Bacci B, Morandi F, De Meo M, Marcato PS. Ten cases of feline mesothelioma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *J Comp Pathol*, 134: 347-354, 2006.

Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil Suppl*, 43:125-38, 1991.

Baker MI e Hutson JM. Serum levels of Müllerian Inhibiting Substance in boys throughout puberty and in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab*, 76: 245-247, 1993.

Ball BA, Conley AJ, Grundy S, Sabeur K, Liu IKM. Expression of Anti-Müllerian Hormone (AMH) In Equine Testes. *Theriogenology*, 69: 624-31, 2008.

Banco B, Giudice C, Veronesi MC, Gerosa E, Grieco V. An immunohistochemical study of normal and neoplastic canine sertoli cells. *J Comp Pathol*, 143:239-47, 2010.

Banco B, Veronesi MC, Giudice C, Rota A, Grieco V. Immunohistochemical Evaluation of the Expression of Anti-Müllerian Hormone in Mature, Immature and Neoplastic Canine Sertoli Cells. *J Comp Pathol*, Epub ahead of print, 2011.

Banks WJ. *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Seconda Edizione, Casa editrice Piccin Nuova Libreria, Padova, 1991.

Barone R. Apparecchio genitale femminile. In: Barone R., *Anatomia comparata dei mammiferi domestici-Splanchnologia*. Editore: Edagricole. 4: pp. 223-264, 1994.

Bar-Shira Maymon B, Paz G, Elliott DJ, Hammel I, Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, Botchan A, Yavetz H. Maturation phenotype of Sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod*, 15: 1537-1542, 2000.

Barsoum I e Hung-Chang Yao H. The road to maleness: from testis to Wolffian duct. *Trends Endocrinol Metab*, 17: 223-228, 2006.

Bateman AC, Al-Talib RK, Newman T, Williams JH, Herbert A. Immunohistochemical phenotype of malignant mesothelioma: predictive value of CA125 and HBME-1 expression. *Histopathology*, 30: 49-56, 1997.

Benjamin E, Law S, Bobrow LG. Intermediate filaments cytokeratin and vimentin in ovarian sex cord-stromal tumours with correlative studies in adult and fetal ovaries. *J Pathol*, 152: 253-263, 1987.

Berezowski K, Stastny JF, Kornstein MJ. Cytokeratins 7 and 20 and carcinoembryonic antigen in ovarian and colonic carcinoma. *Mod Pathol*, 9: 426-429, 1996.

Bergmann M e Kliesch S. The distribution pattern of cytokeratin and vimentin immunoreactivity in testicular biopsies of infertile men. *Anat Embryol*, 190: 515-520, 1994.

Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA. A transgenic insertion upstream of SOX9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet*, 26: 490-494, 2000.

Boguess JF, Soules MR, Goff BA, Greer BE, Cain JM, Tamimi HK. Serum inhibin and disease status in women with ovarian granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol*, 64: 64-69, 1997.

Bonadonna G. Neoplasie dell'ovaio. In: Bonadonna G., *Medicina oncologica*. Quarta edizione. Editore: Masson. pp: 1089-1120, 1999.

Boutross-Tadross O, Saleh R, Asa SL. Follicular variant papillary thyroid carcinoma arising in struma ovarii. *Endocr Pathol*, 18: 182-186, 2007.

Braw-Tal R. Expression of mRNA for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. *J Mol Endocrinol*, 13: 253-264, 1994.

Brehm R, Rey R, Kliesch S, Steger K, Marks A, Bergmann M. Mitotic activity of Sertoli cells in adult testis: an immunohistochemical study to characterize Sertoli cells in testicular cords from patients showing testicular dysgenesis syndrome. *Anatomy and Embryology*, 211: 223-236, 2006.

Brodey RS e Martin JE. Sertoli cell neoplasms in the dog; the clinicopathological and endocrinological findings in thirtyseven dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 133: 249-57, 1958.

Bruening W, Gros P, Sato T, Stanimir J, Nakamura Y, Housman D, Pelletier J. Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. *Cancer Invest*, 11: 393-399, 1993.

Bufo P, Pennella A, Serio G, Mastropasqua MG, Cenacchi G, Rogatsch H, Mikuz G. Malignant large cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis (LCCSCTT). Report of a case in an elderly man and review of the literature. *Pathologica*, 91: 107-14, 1999.

Burger HG. Inhibin. *Rep Med Rev*, 1: 1-20, 1992.

Campbell CM e Middleton AW Jr. Malignant gonadal stromal tumor: case report and review of the literature. *J Urol*, 125: 257-9, 1981.

Cao QJ, Jones JG, Li M. Expression of calretinin in human ovary, testis, and ovarian sex cord-stromal tumors. *Int J Gynecol Pathol*, 20: 346-352, 2001.

Capel B. The battle of the sexes. *Mech Dev*, 92:89-103, 2000.

Cathro HP e Stoler MH. Expression of cytokeratins 7 and 20 in ovarian neoplasia. *Am J Clin Pathol*, 117: 944-951, 2002.

Cathro HP e Stoler MH. The utility of calretinin, inhibin, and WT1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of ovarian tumors. *Hum Pathol*, 36: 195-201, 2005.

Choi YL, Kim HS, Ahn G. Immunoexpression of inhibin alpha subunit, inhibin/activin betaA subunit and CD99 in ovarian tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 124: 563-569, 2000.

Ciriş M, Erhan Y, Zekioglu O, Bayramoglu H. Inhibin alpha and beta expression in ovarian stromal tumors and their histological equivalences. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 83: 491-496, 2004.

Coffin DL, Munson TO, Scully RE. Functional Sertoli cell tumor with metastasis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 121: 352-358, 1952.

Collins DH e Symington T. Sertoli-cell tumour. *Br J Urol*, 36: 52-61, 1964.

Compérat E, Tissier F, Boyé K, De Pinieux G, Vieillefond A. Leydig sex-cord tumors of the testis. The place of immunohistochemistry in diagnosis and prognosis. A study of twenty cases. *Virchows Arch*, 444: 567-571, 2004.

Constantinople NL e Walsh PC. Activity of müllerian-inhibiting substance in postnatal testes. *Surg Forum*, 24: 538-9, 1973.

Cooke I, O'Brien M, Charnock FM, Groome N, Ganesan TS. Inhibin as a marker for ovarian cancer. *Br J Cancer*, 71: 1046-1050, 1995.

Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest*, 52: 243-256, 1985.

Cortes D, Müller J, Skakkebaek NE. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl*, 10: 589-596, 1987.

Costa MJ, Ames PF, Walls J, Roth LM. Inhibin immunohistochemistry applied to ovarian neoplasms: a novel, effective, diagnostic tool. *Hum Pathol*, 28: 1247-1254, 1997.

Costa MJ, DeRose PB, Roth LM, Brescia RJ, Zaloudek CJ, Cohen C. Immunohistochemical phenotype of ovarian granulosa cell tumors: absence of epithelial membrane antigen has diagnostic value. *Hum Pathol*, 25: 60-66, 1994.

Cotchin E. Canine ovarian neoplasms. *Res Vet Sci*, 2: 133-142, 1961.

Cotchin E. Testicular neoplasms in dogs. *J Comp Pathol*, 70: 232-48, 1960.

Czernobilsky B, Moll R, Levy R, Franke WW. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur J Cell Biol*, 37: 175-190, 1985.

Dahlstrom JE, Maxwell LE, Brodie N, Zardawi IM, Jain S. Distinctive microvillous brush border staining with HBME-1 distinguishes pleural mesotheliomas from pulmonary adenocarcinomas. *Pathology*, 33: 287-291, 2001.

Davidson EB, Reaugh FH, Bahr RJ. What is your diagnosis? Abdominally retained testis. *JAVMA*, 228: 203-204, 2006.

Deavers MT, Malpica A, Liu J, Broaddus R, Silva EG. Ovarian sex cord-stromal tumors: an immunohistochemical study including a comparison of calretinin and inhibin. *Mod Pathol*, 16: 584-590, 2003.

De Franca LR, Silva VAS Jr, Chiarini-Garcia H, Garcia K, Debeljuk L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod*, 63: 1629-1636, 2000.

Dehner LP. Primitive neuroectodermal tumor and Ewing's sarcoma. *Am J Surg Pathol*, 17: 1-13, 1993.

De Jong FH, Grootenhuis AJ, Steenbergen J, Van Sluijs FJ, Foekens JA, Ten Kate FJW, Oosterhuis JW, Lamberts SWJ, Klijn JGM. Inhibin immunoreactivity in gonadal and non-gonadal tumors. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 37: 863-866, 1990.

de Kretser DM e Robertson DM. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol Reprod*, 40: 33-47, 1989.

DeLellis RA e Kwan P. Technical considerations in the immunohistochemical demonstration of intermediate filaments. *Am J Surg Pathol*, 12 Suppl 1: 17-23, 1988.

De Miguel MP, Bethencourt FR, Arenas MI, Fraile B, Paniagua R. Intermediate filaments in the Sertoli cells of the ageing human testis. *Virchows Arch*, 431: 131-138, 1997.

Demir A, Onol FF, Türkeri L. Case report: malignant Sertoli cell tumor of the testis in an adult. *Int Urol Nephrol*, 35: 515-6, 2003.

De Raeve H, Schoonooghe P, Wibowo R, Van Marck E, Goossens A. Malignant large cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis. *Pathol Res Pract*, 199:113-7, 2003.

Di Simone N, Crowley WF Jr, Wang QF, Sluss PM, Schneyer AL. Characterization of inhibin/activin subunit, follistatin, and activin type II receptors in human ovarian cancer cell lines: a potential role in autocrine growth regulation. *Endocrinology*, 137: 486-494, 1996.

Dogliani C, Dei Tos AP, Laurino L, Iuzzolino P, Chiarelli C, Celio MR, Viale G. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol*, 20: 1037-1046, 1996.

Donahoe PK, Ito Y, Morikawa Y, Hendren WH. Müllerian inhibiting substance in human testes after birth. *J Pediatr Surg*, 12: 323-30, 1977 (a).

Donahoe PK, Ito Y, Morikawa Y, Hendren WH. Müllerian Inhibiting Substance in Human Testes after birth. *J Pediatr Surg*, 12:323-30, 1977.

Donahoe PK, Ito Y, Price JM, Hendren WH 3rd. Müllerian inhibiting substance activity in bovine fetal, newborn and prepubertal testes. *Biol Reprod*, 16:238-43, 1977 (b).

Donahoe PK. Müllerian Inhibiting Substance in Reproduction and Cancer. *Mol Reprod Dev*, 32: 168-172, 1992.

Dow C. Testicular tumours in the dog. *J Comp Pathol*, 72: 247-245, 1962.

Dow C. Ovarian abnormalities in the bitch. *J Comp Pathol*, 70: 59-69, 1960.

Doxsee AL, Yager JA, Best SJ, Foster RA. Extratesticular interstitial and Sertoli cell tumors in previously neutered dogs and cats: a report of 17 cases. *Can Vet J*, 47:763-6, 2006.

Eramaa M, Heikinheimo K, Voutilainen R. Developmental and cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent regulation of inhibin subunit messenger

ribonucleic acids in human fetal testes. *J Clin Endocrinol Metab*, 75: 806-811, 1992.

Espinosa de los Monteros A, Fernández A, Millán MY, Rodríguez F, Herráez P, Martín de las Mulas J. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. *Vet Pathol*, 36: 179-190, 1999.

Featherstone JM, Fernando HS, Theaker JM, Simmonds PD, Hayes MC, Mead GM. Sex cord stromal testicular tumors: a clinical series-uniformly stage I disease. *J Urol*, 181: 2090-6, 2009.

Fellinger EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ. Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32MIC2. *Am J Pathol*, 139: 317-325, 1991.

Flemming P, Grothe W, Maschek H, Petry KU, Wellmann A, Georgii A. The site of inhibin production in ovarian neoplasms. *Histopathology*, 29: 465-468, 1996.

Flemming P, Wellmann A, Maschek H, Lang H, Georgii A. Monoclonal antibodies against inhibin represent key markers of adult granulosa cell tumors of the ovary even in their metastases. A report of three cases with late metastasis, being previously misinterpreted as hemangiopericytoma. *Am J Surg Pathol*, 19: 927-933, 1995.

Foster RA e Ladds PW. Male genital system. In: Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals: III Vol. 5<sup>th</sup> edition*, pag.565-620. Saunders Ltd, 2007.

Foster RA. Female reproductive system. In: McGavin MD, Zachary JF. *Pathologic basis of veterinary disease. Quarta edizione*. Editore: Mosby Elsevier. Cap. 18, pp. 1280-1281, 2006.

Francavilla S, Cordeschi G, Properzi G, Concordia N, Cappa F, Pozzi V. Ultrastructure of fetal human gonad before sexual differentiation and during early testicular and ovarian development. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 22: 389-400, 1990.

Franke FE, Pauls K, Rey R, Marks A, Bergmann M, Steger K. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol*, 204: 169-177, 2004.

Franke WW, Grund C, Schmid E. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *Eur J Cell Biol*, 19:269-75, 1979.

Fridmacher V, Locquet O, Magre S. Differential expression of acidic cytokeratins 18 and 19 during sexual differentiation of the rat gonad. *Development*, 115:503-17, 1992.

Fröjdman K, Paranko J, Kuopio T, Pelliniemi LJ. Structural proteins in sexual differentiation of embryonic gonads. *Int J Dev Biol*, 33: 99-103, 1989.

Fröjdman K, Paranko J, Virtanen I, Pelliniemi LJ. Intermediate filaments and epithelial differentiation of male rat embryonic gonad. *Differentiation*, 50:113-23, 1992.

Garde SV, Moodbidri SB, Sheth AR. Localization of inhibin in the testes of human, bonnet monkey, dog and rat by immunoperoxidase technique. *Indian J Exp Biol.*, 27: 404-407, 1989.

Garde SV e Sheth AR. Immunoperoxidase localization of prostatic inhibin peptide in human, monkey, dog, and rat prostates. *Anat Rec*, 223: 181-184, 1989.

Goedegebuure SA. Secondary bone tumours in the dog. *Vet Pathol*, 16:520-9, 1979.

Goldstein NS e Uzieblo A.. WT1 immunoreactivity in uterine papillary serous carcinomas is different from ovarian serous carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 117: 541-545, 2002.

Gordon MD, Corless C, Renshaw AA, Beckstead J. CD99, keratin, and vimentin staining of sex cord-stromal tumors, normal ovary, and testis. *Mod Pathol*, 11: 769-773, 1998.

Grieco V, Banco B, Ferrari A, Rota A, Faustini M, Veronesi MC. Inhibin- $\alpha$  immunohistochemical expression in mature and immature canine Sertoli and Leydig cells. *Reprod Domest Anim*, 46: 920-3, 2011.

Grieco V, Riccardi E, Veronesi MC, Giudice C, Finazzi M. Evidence of testicular dysgenesis syndrome in the dog. *Theriogenology*, 70: 53-60, 2008.

Gunsalus GL, Larrea F, Musto NA, Becker RR, Mather JP, Bardin CW. Androgen binding protein as a marker for Sertoli cell function. *J Steroid Biochem*, 15:99-106, 1981.

Gurusinghe CJ, Healy DL, Jobling T, Marners P, Burger HG. Inhibin and activin are demonstrable by immunohistochemistry in ovarian tumor tissue. *Gynecol Oncol*, 57: 27-32, 1995.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*, 121: 1603-1614, 1995.

Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA, Crowley WF Jr. Differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1835-1841, 1998.

Healy DL, Burger HG, Mamers P, Jobling T, Bangah M, Quinn M, Grant P, Day AJ, Rome R, Campbell JJ. Elevated serum inhibin concentrations in postmenopausal women with ovarian tumors. *N Engl J Med.*, 329: 1539-1542, 1993.

Henley JD, Young RH, Ulbright TM. Malignant Sertoli cell tumors of the testis: a study of 13 examples of a neoplasm frequently misinterpreted as seminoma. *Am J Surg Pathol*, 26: 541-50, 2002.

Hildebrandt RH, Rouse RV, Longacre TA Value of inhibin in the identification of granulosa cell tumors of the ovary. *Hum Pathol*, 28: 1387-1395, 1997.

Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH, Mason A.J. Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *Mol Cell Endocrinol*, 72:1206-11, 1991.

Hilscher B e Engemann A. Histological and morphometric studies on the kinetics of germ cells and immature Sertoli cells during human prespermatogenesis. *Andrologia*, 24: 7-10, 1992.

Hirobe S, He WW, Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*, 131: 854-862, 1992.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29: 577-580, 1981.

Hudson PL, Douglas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB, MacLaughlin DT. An immunoassay to detect human müllerian inhibiting

substance in males and females during normal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 70: 16-22, 1990.

Hussong J, Woodruff T, Keh PC. Immunohistochemical study of primary ovarian tumors with inhibin antibody. *Mod Pathol*, 1: 102A, 1997.

Hutchison GR, Scott HM, Walker M, McKinnell C, Ferrara D, Mahood IK, Sharpe RM. Sertoli cell development and function in an animal model of testicular dysgenesis syndrome. *Biol Reprod*, 78: 352-360, 2008.

Iczkowski KA, Bostwick DG, Roche PC, Cheville JC. Inhibin A is a sensitive and specific marker for testicular sex cord-stromal tumors. *Mod Pathol*, 11: 774-779, 1998.

Izadyar F, Dijkstra G, Van Tol HT, Van den Eijnden-van Raaij AJ, Van den Hurk R, Colenbrander B, Bevers MM. Immunohistochemical localization and mRNA expression of activin, inhibin, follistatin, and activin receptor in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev*, 49: 186-195, 1998.

Jin W, Wada S, Arai KY, Kishi H, Herath CB, Watanabe G, Suzuki AK, Groome NP, Taya K. Testicular secretion of inhibin in the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Androl*, 22 :207-11, 2001.

Jobling T, Mamers P, Healy DL, MacLachlan V, Burger HG, Quinn M, Rome R, Day AJ. A prospective study of inhibin in granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*, 55: 285-289. 1994.

Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell number and age related decline. *Biol Reprod*, 31: 785-795, 1984.

Josso N, Lamarre I, Picard JY, Berta P, Davies N, Morichon N, Peschanski M, Jeny R. Anti-Müllerian Hormone in early human development. *Early Hum Dev*, 33: 91-99, 1993.

Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain JL, Brauner R. An enzyme linked immunoassay for anti-müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab*, 70: 23-27, 1990.

Josso N, Picard JY, Rey R, di Clemente N. Testicular Anti-Müllerian Hormone: History, Genetics, Regulation and Clinical Applications. *Pediatr Endocrinol Rev*, 3: 347-358, 2006.

Josso N, Picard JY, Tran D. The Anti-Müllerian Hormone. *Rec prog Horm Res*, 33: 117-160, 1977.

Jost A. Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. Rôle des gonads foetales dans la differenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc morphol Exp*, 36: 271-315, 1947.

Jost A. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 8: 379-418; 1953.

Jost A. Gonadal hormones in the sex differentiation of the mammalian fetus. In: *Organogenesis*, pag. 621-623. Holt, Reinhart and Winston, New York, 1965.

Jost A, Vigier B, Prépin J, Perchellet JP. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res*, 29:1- 41, 1973.

Kawakami E, Tsutsui T, Ogasa A. Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. *J Vet Med Sci*, 53: 241-8, 1991.

Kennedy AD, King G, Kerry KM. HBME-1 and antithrombomodulin in the differential diagnosis of malignant mesothelioma of pleura. *J Clin Pathol*, 50: 859-862, 1997.

Kennedy PC, Cullen JM, Edwards JF, Goldschmidt MH, Larsen S, Munson L, Nielsen S. Histological Classification of Tumors of the Genital System of Domestic Animals. In World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Serie 2°, Vol. 4, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1998.

Kim Y, Kim JS, Song MS, Seo HS, Kim JC, Bae CS, Kim S, Shin T, Kim SH, Moon C. The expression and localization of inhibin isotypes in mouse testis during postnatal development. *J Vet Sci*, 9: 345-349, 2008.

Kim YS, Chae YS, Kim I, Paik SY. Immunohistochemical staining of ovarian tumors. *Kor J Pathol*, 25: 11-17, 1991.

King JE, Thatcher N, Pickering CA, Hasleton PS. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology*, 48: 223-232, 2006.

Klein MK. Tumors of the female reproductive system. In: Withrow S.J., Vail D.M., Small animal clinical oncology. Quarta edizione. Editore: Saunders Elsevier. Cap. 25: pp. 610-613, 2007.

Kliesch S, Behre HM, Hertle L, Bergmann M. Alteration of Sertoli cell differentiation in the presence of carcinoma in situ in human testes. *J Urol*, 160:1894-8, 1998.

Knight PG e Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, 121: 503-512, 2001.

Knight PG, Castillo RJ, Glencross RG., Beard AJ, Wrathall JH. Isolation of bovine ovarian inhibin, its immunoneutralization in vitro and immunolocalization in bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol*, 7: 299-313, 1990.

Kobayashi M, Yamoto M, Minami S, Imai M, Nakano R. Immunohistochemical localization of inhibin alpha- and beta A-subunits in the ovary of immature female rats. *Eur J Endocrinol*, 132: 97-102, 1995.

Kolon TF e Hochman HI. Malignant Sertoli cell tumor in a prepubescent boy. *J Urol*, 158: 608-9, 1997.

Kommos F, Oliva E, Bhan AK, Young RH, Scully RE. Inhibin expression in ovarian tumors and tumor-like lesions: an immunohistochemical study. *Mod Pathol*, 11: 656-664, 1998.

Kommos F, Oliva E, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Amin MB, Bhan AK, Young RH, Scully RE. Inhibin- $\alpha$ , CD99, HEA125, PLAP, and Chromogranin immunoreactivity in testicular neoplasm and the androgen insensitivity syndrome. *Hum Pathol*, 31: 1055-1061, 2000.

Kratzer SS, Ulbright TM, Talerman A, Srigley JR, Roth LM, Wahle GR, Moussa M, Stephens JK, Millos A, Young RH. Large cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis: contrasting features of six malignant and six benign tumors and a review of the literature. *Am J Surg Pathol*, 21: 1271-80, 1997.

Kronz JD, Nicol TL, Rosenthal DL, Ali SZ. Metastatic testicular Sertoli-cell tumor: cytopathologic findings on fine-needle aspiration. *Diagn Cytopathol*, 19: 127-30, 1998.

Krückmann I. Intersexualität bei beiderseitigen tubulären Hodenadenomen. *Virchows Arch f path Anat*, 298: 619-635, 1937.

Kuroda T, Lee MM, Haqq CM, Powell DM, Manganaro TF, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes. *Endocrinology*, 127: 1825-1832, 1990.

Laing EJ, Harari J, Smith CW. Spermatic cord torsion and Sertoli cell tumor in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 183: 879-81, 1983.

Lane AH, Lee MM, Fuller AF Jr, Kehas DJ, Donahoe PK, MacLaughlin DT. Diagnostic utility of Müllerian inhibiting substance determination in patients with primary and recurrent granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol*, 73: 51-55, 1999.

Lappöhn RE, Burger HG, Bouma J, Bangah M, Krans M, de Bruijn HW. Inhibin as a marker for granulosa-cell tumors. *N Engl J Med*, 321: 790-793, 1989.

Lawrence WD, Young RH, Scully RE. Sex Cord-stromal tumors. In: Talerman A and Roth LM (eds), *Pathology of the testis and its adnexa*, pag. 67-92. New York, Churchill Livingstone, 1986.

Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Shoenfeld D, McLaughlin DT. Müllerian Inhibiting Substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 571-576, 1996.

Lee MM e Donahoe PK. Müllerian Inhibiting Substance: a Gonadal Hormone with multiple functions. *Endocr Rev*, 14: 152-164, 1993.

Lindegaard Madsen E e Mørck Hultberg B. Metastasizing Sertoli cell tumours of the human testis- a report of two cases and a review of the literature. *Acta Oncol*, 29: 946-9, 1990.

Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*, 321: 779-782, 1986.

Lipowitz AJ, Schwartz A, Wilson GP, Ebert JW. Testicular neoplasms and concomitant clinical changes in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, 163: 1364-8, 1973.

Loo KT, Leung AKF, Chan JKC. Immunohistochemical staining of ovarian granulosa cell tumors with MIC-2 antibody. *Histopathology*, 27: 388-390, 1995.

Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update*, 11: 123-135, 2005.

MacLachlan NJ. Ovarian disorders in domestic animals. *Environ Health Perspect*, 73: 27-33, 1987.

MacLachlan NJ e Kennedy PC. Tumors of the genital system. In Meuten DJ. *Tumours in Domestic Animals*, Iowa State Press. 2002, pp 561-563.

Majdic G, McNeilly AS, Sharpe M, Evans LR, Groome NP, Saunders P. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology*, 138: 2136-2147, 1997.

Mann DR, Akinbami MA, Wallen K, Gould KG, Groome NP, Swanston I, McNeilly AS, Fraser HM. Inhibin-B in the male rhesus monkey: impact of the

neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment and sexual development. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:1928-1933, 1997.

Marino G, Nicòtina PA, Catone G, Bontempo RA, Zanghì A. Alpha-inhibin expression in canine ovarian neoplasms: preliminary results. *Vet Res Commun*, 27 Suppl 1: 237-240, 2003a.

Marino G, Zanghì A, Catone G, Bontempo RA, Nicòtina PA. Expression of inhibin/activin alpha, betaA and betaB subunits in the ovary of the bitch. *Vet Res Commun*, 27 Suppl 1: 611-614, 2003b.

Marshall GR e Plant TM. Puberty occurring either spontaneously or induced precociously in rhesus monkey is associated with a marked proliferation of Sertoli cells. *Biol Reprod*, 54:1192-1199, 1996.

Mather JP, Moore A, Li RH. Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc Soc Exp Biol Med*, 215: 209-222, 1997.

Matias-Guiu X, Pons C, Prat J. Müllerian inhibiting substance, alpha-inhibin, and CD99 expression in sex cord-stromal tumors and endometrioid ovarian carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. *Hum Pathol*, 29: 840-845, 1998.

Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*, 360: 313-319, 1992.

Matzuk MM, Kumar TR, Shou W, Coerver KA, Lau AL, Behringer RR, Finegold MJ. Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. *Recent Prog Horm Res*, 51:123-54, 1996.

McCluggage WG e Maxwell P. Immunohistochemical staining for calretinin is useful in the diagnosis of ovarian sex cord-stromal tumours. *Histopathology*, 38: 403-408, 2001.

McCluggage WG e Young RH. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the evaluation of ovarian tumors. *Semin Diagn Pathol*, 22: 3-32, 2005.

McCluggage WG, Shanks JH, Whiteside C, Maxwell P, Banerjee SS, Biggart JD. Immunohistochemical study of testicular sex cord-stromal tumors, including staining with anti-inhibin antibody. *Am J Surg Pathol*, 22: 615-9, 1998.

McCluggage WG. Value of inhibin staining in gynecological pathology. *Int J Gynecol Pathol*, 20: 79-85, 2001.

McNutt MA, Bolen JW, Gown AM, Hammar SP, Vogel AM. Coexpression of intermediate filaments in human epithelial neoplasms. *Ultrastruct Pathol*, 9: 31-43, 1985.

Meunier H, Cajander SB, Roberts VJ, Rivier C, Sawchenko PE, Hsueh AJ, Vale W. Rapid changes in the expression of inhibin alpha-, beta A-, and beta B-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol Endocrinol*, 2: 1352-1363, 1988.

Meyers-Wallen VN, Donahoe PK, Manganaro TF, Patterson DF. Mullerian Inhibiting Substance in sex-reversed dogs. *Biol Reprod*, 37:1015-1022, 1987.

Meyers-Wallen VN, Donahoe PK, Ueno S, Manganaro TF, Patterson DF. Mullerian Inhibiting Substance is present in testes of dogs with Persistent Mullerian Duct Syndrome. *Biol Reprod*, 41: 881-888, 1989.

Meyers-Wallen VN, Lee MM, Manganaro TF, Kuroda T, McLaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian Inhibiting Substance is present in embryonic testes of

dogs with Persistent Mullerian Duct Syndrome. *Biol Reprod*, 48: 1410-1418, 1993.

Meyers-Wallen VN, Manganaro TF, Kuroda T, Concannon PW, McLaughlin DT, Donahoe PK. The critical period for Müllerian Duct Regression in the Dog Embryo. *Biol Reprod*, 45: 626-633, 1991.

Miettinen M e Kovatich AJ. HBME-1 a monoclonal antibody useful in the differential diagnosis of mesothelioma, adenocarcinoma, and soft-tissue and bone tumors. *Applied Immunohistochemistry*, 3: 115-122, 1995.

Miettinen M, Virtanen I, Talerman A. Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *Am J Pathol*, 120: 402-10, 1985.

Minami S, Yamoto M, Nakano R. Sources of inhibin in early pregnancy. *Early Pregnancy*, 1: 62-66, 1995.

Moore KL. The developing human. In: Moore K.L., *Clinically oriented embryology*. Editore: W.B. Saunders Co. Eth. pp. 265, 1988.

Morris J, Dobson JM. Apparato genitale-ovaio. In: Morris J., Dobson J.M., *Oncologia clinica*. Editore: Utet. pp: 195-198, 2003.

Morrison WB. Cancer of reproductive tract. In: Morrison W.B., *Cancer in dogs and cats*. Seconda edizione. Editore: Teton New Media. pp: 555-564, 2002.

Mostofi FK e Davis J Jr. Rare tumors of testes and adnexal tumors. *Ettore Majorana International Science Series. Life Sci*, 18:29-39, 1985.

Mostofi FK e Sesterhenn IA. Histological typing of testis tumors. In: "World Health Organization International Histological Classification of Tumors". Second edition, World Health Organization, Ginevra, 1998.

Mostofi FK. Proceedings: Testicular tumors. Epidemiologic, etiologic, and pathologic features. *Cancer*, 32: 1186-201, 1973.

Movahedi-Lankarani S e Kurman RJ. Calretinin, a more sensitive but less specific marker than alpha-inhibin for ovarian sex cord-stromal neoplasms: an immunohistochemical study of 215 cases. *Am J Surg Pathol*, 26: 1477-1483, 2002.

Münsterberg A e Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggest a role in both male and female sex differentiation. *Development*, 113: 613-624, 1991.

Nagamine N, Nambo Y, Nagata S, Nagaoka K, Tsunoda N, Taniyama H, Tanaka Y, Tohei A, Watanabe G, Taya K. Inhibin secretion in the mare: localization of inhibin alpha, betaA, and betaB subunits in the ovary. *Biol Reprod*, 59: 1392-1398, 1998.

Nickel R. Apparato genitale. In: Nickel R., Schummer A., Seiferle E. *Trattato di anatomia degli animali domestici II*. Editore: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 364-407, 2006.

Nielsen K e Jacobsen GK. Malignant Sertoli cell tumour of the testis. An immunohistochemical study and a review of the literature. *APMIS*, 96: 755-760, 1988.

Nistal M, Abaurrea MA, Paniagua R. Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *J Anat*, 14: 351-363, 1982.

Nogales FF, Andujar M, Zuluaga A, García-Puche JL. Malignant large cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis. *J Urol*, 153: 1935-7, 1995.

Norris HJ, Garner FM, Taylor HB. Comparative pathology of ovarian neoplasms. IV. Gonadal stromal tumours of canine species. *J Comp Pathol*, 80: 399-405, 1970.

O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Monteiro A, Cassie S, Bhattacharya S, Fowler PA. Developmental changes in human fetal testicular cell number and messengers ribonucleic acid levels during the second trimester. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 4792-4801, 2007.

O'Dowd J, Gaffney EF, Young RH. Malignant sex cord-stromal tumour in a patient with the androgen insensitivity syndrome. *Histopathology*, 16:279-82, 1990.

Okamoto S, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Takao M, Yanaihara N, Takakura S, Ochiai K, Tanaka T. Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts. *Oncol Rep*, 21: 1209-1214, 2009.

O'Rahilly R. The embryology and anatomy of the uterus. In: Norris HJ, Hertig AT, Abell MR, eds. *The Uterus*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Company, pp.17-39, 1973.

Ordóñez NG. Value of thyroid transcription factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 24: 598-606, 2000.

Ordóñez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 27: 1031-1051, 2003.

Ordóñez NG e Nelson G. Role of immunohistochemistry in distinguishing epithelial peritoneal mesotheliomas from peritoneal and ovarian serous carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 22: 1203-1214, 1998.

Otis CN, Powell JL, Barbuto D, Carcangiu ML. Intermediate filamentous proteins in adult granulosa cell tumors. An immunohistochemical study of 25 cases. *Am J Surg Pathol*, 16: 962-968, 1992.

Paranko J, Kallajoki M, Pelliniemi LJ, Letho VP, Virtanen F. Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Dev Biol*, 177: 35-44, 1986.

Park KJ, Bramlage MP, Ellenson LH, Pirog EC. Immunoprofile of adenocarcinomas of the endometrium, endocervix, and ovary with mucinous differentiation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 17: 8-11, 2009.

Park SH e Kim I. Histogenetic consideration of ovarian sex cord-stromal tumors analyzed by expression pattern of cytokeratins, vimentin, and laminin. Correlation studies with human gonads. *Pathol Res Pract*, 190: 449-456, 1994.

Patnaik AK e Greenlee PG. Canine ovarian neoplasms: a clinicopathologic study of 71 cases, including histology of 12 granulosa cell tumors. *Vet Pathol*, 24: 509-514, 1987.

Patnaik AK e Mostofi FK. A clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical study of mixed-germ cell-stromal tumors of the testis in 16 dogs. *Vet Pathol*, 30: 287-295, 1993.

Pelagalli GV e Botte V. Apparato urogenitale. In: *Anatomia veterinaria sistematica e comparata*. Editore: Edi-Ermes. Vol. 1: pp. 418-423, 2003.

Pelkey TJ, Frierson HF Jr, Mills SE, Stoler MH. The diagnostic utility of inhibin staining in ovarian neoplasms. *Int J Gynecol Pathol*, 17: 97-105, 1998.

Pelliniemi LJ e Fröjdman K. Structural and regulatory macromolecules in sex differentiation of gonads. *J Exp Zool*, 290: 523-8, 2001.

Pelliniemi LJ, Frojdman K, Paranko J. Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: Russel L.D., Griswold MD, "The Sertoli Cell". 1st edition (pp. 2-10). Cache River Press, 1993.

Perlman EJ, Dickman PS, Askin FB, Grier HE, Miser JS, Link MP. Ewing's sarcoma--routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *Hum Pathol*, 25: 304-307, 1994.

Peters MAJ, Teerds KJ, Van der Gaag I, De Rooij DG, Van Sluijs FJ. Use of antibodies against LH receptor, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and vimentin to characterize different types of testicular tumour in the dogs. *Reproduction*, 121: 287-296, 2001.

Petersen C e Soder O. The Sertoli cell- A hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res*, 66: 153-161, 2006.

Peyron A. Sur les tumeurs des glandes genitales (Avec prèsentation de documents embryologique). *Bull Assoc Franç p l' etude du cancer*, 11: 215-274, 1922.

Pick L. Ueber Neubildungen am Genitalen bei Zwittern, nebst Beiträgen zur Lehre von den Adenomen des Hoden und Eierstockes. *Arch Gynak*, 76: 191-281, 1905.

Picon R, Picon L, Chaffaux S, Ktorza A. Effects of canine fetal testes and testicular tumors on Müllerian Ducts. *Biol Reprod*, 18: 459-467, 1978.

Pluhar GE, Memon MA, Wheaton LG. Granulosa cell tumor in an ovariohysterectomized dog. *J Am Vet Med Assoc*, 207: 1063-1065, 1995.

Puls LE, Hamous J, Morrow MS, Schneyer A, MacLaughlin DT, Castracane VD. Recurrent ovarian sex cord tumor with annular tubules: tumor marker and chemotherapy experience. *Gynecol Oncol*, 54: 396-401, 1994.

Qin Y, Kong LK, Poirier C, Truong C, Overbeek PA, Bishop CE. Long-range activation of SOX9 in odd sex mice. *Hum Mol Genet*, 13: 1213-1218, 2004.

Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, Vaughan J, Vale W, Jaffe RB. Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab*, 73: 1141-1149, 1991.

Reif JS e Brodey RS. The relationship between cryptorchidism and canine testicular neoplasia. *J Am Vet Med Assoc*, 155: 2005-10, 1969.

Renshaw AA, Pinkus GS, Corson JM. HBME-1 aids in distinguishing mesotheliomas and adenocarcinomas of the lung and breast. *Mod Pathol*, 8: 152A, 1995.

Rey R. Endocrine, paracrine and cellular regulation of postnatal Anti- Müllerian Hormone secretion by Sertoli cells. *Trends Endocrinol Metab*, 9: 271-276, 1998.

Rey R. Anti-Müllerian Hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 49: 26-36, 2005.

Rey R, al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fékété C, Chaussain JL, Josso N. Testicular dysgenesis does not affect expression of Anti-Müllerian

Hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am J Pathol*, 148: 1689-98, 1996.

Rey R e Josso N. Regulation of testicular Anti-Müllerian Hormone secretion. *Eur J Endocrinol*, 135: 144-152, 1996.

Rey RA, Lhommé C, Marcillac I, Lahlou N, Duvillard P, Josso N, Bidart JM. Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: comparative study with serum alpha-inhibin and estradiol. *Am J Obstet Gynecol*, 174: 958-965, 1996.

Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL, Josso N. Anti- Müllerian Hormone and testosterone Serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 77: 1220-1226, 1993.

Rey R, Sabourin JC, Venara M, Long WK, Jaubert F, Zeller P, Duvillard P, Chemes H, Bidart JM. Anti Müllerian Hormone is a specific marker of Sertoli-and Granulosa-Cell origin in Gonadal Tumors. *Hum Pathol*, 31:1202-8, 2000.

Riccardi E, Grieco V, Verganti S, Finazzi M. Immunohistochemical diagnosis of canine ovarian epithelial and granulosa cell tumors. *J Vet Diagn Invest*, 19: 431-435, 2007.

Riera JR, Astengo-Osuna C, Longmate JA, Battifora H. The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma: a reevaluation after heat-induced epitope retrieval. *Am J Surg Pathol*, 21: 1409-1419, 1997.

Rishi M, Howard LN, Bratthauer GL, Tavassoli FA. Use of monoclonal antibody against human inhibin as a marker for sex cord-stromal tumors of the ovary. *Am J Surg Pathol*, 21: 583-589, 1997.

Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science*, 234: 205-208, 1986.

Roberts VJ. Tissue-specific expression of inhibin/activin subunit and follistatin mRNAs in mid- to late-gestational age human fetal testis epididymis. *Endocrine*, 6: 85-90, 1997.

Robertson DM, Hayward S, Irby D, Jacobsen J, Clarke L, McLachlan RI, de Kretser DM. Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG stimulation and gonadectomy. *Mol Cell Endocrinol*, 58: 1-8, 1988.

Rogatsch H, Jezek D, Hittmair A, Mikuz G, Feichtinger H. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumor-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch*, 427: 497-502, 1996.

Rokukawa S, Inoue K, Miyamoto K, Kurosumi K, Igarashi M. Immunohistochemical localization of inhibin in porcine and bovine ovaries. *Arch Histol Jpn*, 49: 603-611, 1986.

Romeo R, Castorina S, Marcello MF. Intermediate filaments of human Sertoli cells in germinal alterations. *Ital J Anat Embryol*, 100:75-81, 1995.

Rosvoll RV e Woodard JR. Malignant Sertoli cell tumor of the testis. *Cancer*, 22: 8-13, 1968.

Roth LM, Liban E, Czernobilsky B. Ovarian endometrioid tumors mimicking Sertoli and Sertoli-Leydig cell tumors: Sertoliform variant of endometrioid carcinoma. *Cancer*, 50: 1322-1331, 1982.

Rowley MJ e Heller CG. Quantitation of the cells of the seminiferous epithelium of the human testis, employing the Sertoli cells as a constant. *Z Zellforsch Mikrosch Anat*, 115:461-472, 1971.

Russel LD. Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. In: Russel LD, Griswold MD, "The Sertoli Cell".1st edition (pp. 2-10), Cache River Press, 1993.

Sabocanec R, Culjak K, Vrbanac L, Potocnjak D, Stanin D, Vranesić D, Karacić T. A case of metastasizing ovarian granulosa cell tumour in the myocardium of a bitch. *Acta Vet Hung*, 44: 189-194, 1996.

Sánchez B, Pizarro M, García P, Flores JM. Postnatal development of seminiferous tubules in the cat. *J Reprod Fertil Suppl*, 47:343-8, 1993.

Savera AT, Raju U, Linden MD. Mesothelioma vs. adenocarcinoma: diagnostic utility of HBME-1. *Lab invest*, 74: p. 162A (abstr), (1996).

Schlafer DH e Miller RB. Female genital system. In: Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals: III Vol. 5<sup>th</sup> edition*, pag.450-456. Saunders Ltd, 2007.

Schumer ST e Cannistra SA. Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol*, 21: 1180-1189, 2003.

Scully RE. Sex cord-mesenchyme tumours: pathologic classification and its relation to prognosis and treatment. In: *Ovarian Cancer*, ed. by Gentil F and Junqueira AC, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1968.

Scully RE. Granulosa cell tumors. In: Scully RE, Histological Typing of Ovarian Tumors. World Health Organization, International Histological Classification of Tumors. Seconda edizione. Editore: Springer. pp 20-21, 1999.

Scully RE e Coffin DL. Canine testicular tumors with special reference to their histogenesis, comparative morphology, and endocrinology. *Cancer*, 5: 592-605, 1952.

Sforna M, Brachelente C, Lepri E, Mechelli L. Canine Ovarian Tumours: A Retrospective Study of 49 Cases. *Vet Res Commun*, 27 Suppl 1: 359–361, 2003.

Shah VI, Freitas ON, Maxwell P, McCluggage WG. Inhibin is more specific than calretinin as an immunohistochemical marker for differentiating sarcomatoid granulosa cell tumour of the ovary from other spindle cell neoplasms. *J Clin Pathol*, 56: 221-224, 2003.

Sharma S, Seam RK, Kapoor HL. Malignant Sertoli cell tumour of the testis in a child. *J Surg Oncol*, 44: 129-31, 1990.

Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar M. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil*, 101: 193-198, 1994.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125: 769-784, 2003.

Sharpe RM, Turner KJ, McKinnell C, Groome NP, Atanassova N, Millar MR, Buchanan DL, Cooke PS. Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to

adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *J Androl*, 20: 94-101, 1999.

Shikone T, Matzuk MM, Perlas E, Finegold MJ, Lewis KA, Vale W, Bradley A, Hsueh AJ. Characterization of gonadal sex cord-stromal tumor cell lines from inhibin-alpha and p53-deficient mice: the role of activin as an autocrine growth factor. *Mol Endocrinol*, 8: 983-995, 1994.

Shimizu M, Toki T, Takagi Y, Konishi I, Fujii S. Immunohistochemical detection of the Wilms' tumor gene (WT1) in epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol*, 19: 158-163, 2000.

Sivacolundhu RK, O'Hara AJ, Read RA. Granulosa cell tumour in two speyed bitches. *Aust Vet J*, 79: 173-176, 2001.

Steele GS e Richie JP. Current role of retroperitoneal lymph node dissection in testicular cancer. *Oncology (Williston Park)*, 11: 717-29, 1997.

Steger K, Rey R, Kliesch S, Louis F, Schleicher G, Bergmann M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl*, 19: 122-8, 1996.

Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann M. Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Human Reproduction*, 14: 136-143, 1999.

Steinberger A, Steinberger E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and organ culture. *Biol Reprod*, 4: 84-87, 1971.

Stevenson AJ, Chatten J, Bertoni F, Miettinen M. CD99 neuroectodermal/Ewing's sarcoma antigen as an immunohistochemical marker. *Appl Immunohistochem*, 2: 231-240, 1994.

Stosiek P, Kasper M, Karsten U. Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation*, 43: 66-70, 1990.

Taguchi O, Cunha GR, Lawrence WD, Robboy SJ. Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev Biol*, 106: 394-398, 1984.

Takahashi M, Koide SS, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. *Mol Cell Endocrinol*, 47: 225-234, 1986.

Talerman A. Malignant Sertoli cell tumor of the testis. *Cancer*, 28: 446-55, 1971.

Talerman A e Roth LM. *Pathology of the testis and its adnexa*. 1st edition, p.182, Churchill Livingstone Inc., New York, Edinburgh, London, Melbourne, 1986.

Taniyama H, Hirayama K, Nakada K, Numagami K, Yaosaka N, Kagawa Y, Izumisawa Y, Nakade T, Tanaka Y, Watanabe G, Taya K. Immunohistochemical detection of inhibin- $\alpha$ , - $\beta$ B, and  $\beta$ A chains and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in canine testicular tumors and normal testes. *Vet Pathol*, 38: 661-666, 2001.

Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev*, 22: 657-674, 2001.

Tran D, Muesy-Dessole N, Josso N. Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature*, 269: 411-2, 1977.

Tran D, Picard JY, Campargue J, Josso N. Immunocytochemical detection of Anti-Mullerian Hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human. *J Histochem Cytochem*, 35: 733-743, 1987.

Ulbright TM, Srigley JR, Reuter VE, Wojno K, Roth LM, Young RH. Sex cord-stromal tumors of the testis with entrapped germ cells. A lesion mimicking unclassified mixed germ cell sex cord-stromal tumors. *Am J Surg Pathol*, 24: 535-542, 2000.

Ustun H, Tekakca E, Caydere M, Pulat H, Erol D. A malignant mixed gonadal stromal tumour of the testis with heterologous components. *Int Urol Nephrol*, 28: 109-15, 1996.

Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, Vaughan J, Corrigan A, Bardin W, Sawchenko PI. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res*, 44: 1-34, 1988.

Van Niekerk CC, Boerman OC, Ramaekers FC, Poels LG. Marker profile of different phases in the transition of normal human ovarian epithelium to ovarian carcinomas. *Am J Pathol*, 138: 455-463, 1991.

Van Niekerk CC, Ramaekers FC, Hanselaar AG, Aldeweireldt J, Poels LG. Changes in expression of differentiation markers between normal ovarian cells and derived tumors. *Am J Pathol*, 142: 157-177, 1993.

van Vorstenbosch CJ, Colenbrander B, Wensing CJ, Ramaekers FC, Vooijs GP. Cytoplasmic filaments in fetal and neonatal pig testis. *Eur J Cell Biol*, 34:292-9,1984.

Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, Seidman JD, Ronnett BM. Cytokeratins 7 and 20 in primary and secondary mucinous tumors

of the ovary: analysis of coordinate immunohistochemical expression profiles and staining distribution in 179 cases. *Am J Surg Pathol*, 30: 1130-1139, 2006.

Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. SOX9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet*. 28: 216-217, 2001.

Viebahn C, Lane EB, Ramaekers FC. Keratin and vimentin expression in early organogenesis of the rabbit embryo. *Cell Tissue Res*, 253:553-62, 1988.

Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of Anti-Müllerian Hormone: another omology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*, 114: 1315-1320, 1984.

Vigier B, Tran D, du Mesnil du Buisson F, Heyman Y, Josso N. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Müllerian hormone. *J Reprod Fertil*, 69: 207-14, 1983.

Virtanen I, Kallajoki M, Narvanen O, Paranko J, Thornell LE, Miettinen M, Lehto VP. Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells than contain desmin-type intermediate filaments. *Anat Rec*, 215: 10-20, 1986.

Vitale R, Fawcett DW, Dym M. The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec*. 176: 331-344, 1973.

Vliegen MK, Schlatt S, Weinbauer GF. Localization of inhibin/activin subunits in the testis of adult nonhuman primates and men. *Cell Tissue Res*, 273: 261-268, 1993.

Voutilainen R. Differentiation of the fetal gonad. *Hormonal Researches*, 38: 66-71, 1992.

Wallace EM, Riley SC, Crossley JA, Ritoe SC, Horne A, Shade M, Ellis PM, Aitken DA, Groome NP. Dimeric inhibins in amniotic fluid, maternal serum in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 218-222, 1997.

Wang NP, de Kretser DM, Wreford NG. Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *Int J Androl*, 12: 58-64, 1989.

Wartenberg H. Development of the early human ovary and role of the mesonephros in the differentiation of the cortex. *Anat Embryol (Berl)*, 165: 253-280, 1982.

Wartenberg H. Differentiation and development of the testis. In: "The Testis" HG Burger and DM. de Kretser, Eds, pp. 67-118. Raven Press, New York, 1989.

Wauters CC, Smedts F, Gerrits LG, Bosman FT, Ramaekers FC. Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary. *Hum Pathol*, 26: 852-855, 1995.

Weaver AD. Survey with follow-up of 67 dogs with testicular Sertoli cell tumours. *Vet Rec*, 113: 105-7, 1983.

Weidner N e Tjoe J. Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13: antibody that recognizes glycoprotein p30/32 MIC2 and is useful in diagnosing Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. *Am J Surg Pathol*, 18: 486-494, 1994.

Weng Q, Medan MS, Ren L, Watanabe G, Arai KY, Taya K. Immunolocalization of inhibin/activin subunits in the shiba goat fetal, neonatal, and adult testes. *J Reprod Dev*, 51: 521-6, 2005.

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*, 87: 1-28, 2007.

Witschi E e Mengert WF. Endocrine Studies on Human Hermaphrodites and Their Bearing on the Interpretation of Homosexuality. *J Clin Endocrinol*, 2: 279-286, 1942.

Yamoto M, Minami S, Nakano R. Immunohistochemical localization of inhibin subunits in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 73: 470-477, 1991.

Yamoto M, Minami S, Nakano R, Kobayashi M. Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 74: 989-993, 1992.

Yaziji H, Battifora H, Barry TS, Hwang HC, Bacchi CE, McIntosh MW, Kussick SJ, Gown AM. Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Mod Pathol*, 19: 514-523, 2006.

Ying SY. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev*, 9: 267-293, 1988.

Young RH. Testicular tumors- some new and a few perennial problems. *Arch Pathol Lab Med*, 132:548-64, 2008.

Young RH, Koelliker DD, Scully RE. Sertoli cell tumors of the testis, not otherwise specified: a clinicopathologic analysis of 60 cases. *Am J Surg Pathol*, 22:709-21, 1998.

Young RH, Prat J, Scully RE. Ovarian endometrioid carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. A clinicopathological analysis of 13 cases. *Am J Surg Pathol*, 6: 513-522, 1982.

Young RH, Prat J, Scully RE. Endometrioid stromal sarcomas of the ovary. A clinicopathologic analysis of 23 cases. *Cancer*, 53: 1143-1155, 1984.

Young RH e Scully RE. Ovarian sex cord-stromal tumours: recent advances and current status. *Clin Obstet Gynaecol*, 11: 93-134, 1984.

Yu CH, Hwang DN, Yhee JY, Kim JH, Im KS, Nho WG, Lyoo YS, Sur JH. Comparative Immunohistochemical characterization of canine seminomas and Sertoli cell tumors. *J Vet Sci*, 10: 1-7, 2009.

Zanghì A, Catone G, Marino G, Quartuccio M, Nicòtina PA. Endometrial polypoid adenomyomatosis in a bitch with ovarian granulosa cell tumour and pyometra. *J Comp Pathol*, 136: 83-86, 2007.

Zhang ZH, Hu ZY, Song XX, Xiao LJ, Zou RJ, Han CS, Liu YX. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism. *Int J Androl*, 27: 234-239, 2004.

Zheng W, Luo MP, Welt C, Lambert-Messerlian G, Sung CJ, Zhang Z, Ying SY, Schneyer AL, Lauchlan SC, Felix JC. Imbalanced expression of inhibin and activin subunits in primary epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 69: 23-31, 1998.

Zheng W, Senturk BZ, Parkash V. Inhibin immunohistochemical staining: a practical approach for the surgical pathologist in the diagnoses of ovarian sex cord-stromal tumors. *Adv Anat Pathol*, 10: 27-38, 2003.

Zheng W, Sung CJ, Hanna I, DePetris G, Lambert-Messerlian G, Steinhoff M, Lauchlan SC. Alpha and beta subunits of inhibin/activin as sex cord-stromal differentiation markers. *Int J Gynecol Pathol*, 16: 263-271, 1997.

**APPENDICE**  
**ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI**

## FULL PAPER

- Grieco V, **Banco B**, Giudice C, Mosca F, Finazzi M. Immunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes. *J Comp Pathol.* 2010; 142 (2-3):213-7.
- **Banco B**, Giudice C, Veronesi MC, Gerosa E, Grieco V. An immunohistochemical study of normal and neoplastic canine Sertoli cells. *J Comp Pathol.* 2010; 143(4):239-47.
- **Banco B**, Grieco V, Servida F, Giudice C. Diagnostic Exercise: Sudden Death in a Dog After Doxorubicin Chemotherapy. *Vet Pathol*, published online 3 August 2010.
- **Banco B**, Veronesi MC, Giudice C, Rota A, Grieco V. Immunohistochemical Evaluation of the Expression of Anti-Müllerian Hormone in Mature, Immature and Neoplastic Canine Sertoli Cells. *J Comp Pathol.* 2011, in press.
- Grieco V, **Banco B**, Ferrari A, Rota A, Faustini M, Veronesi M. Inhibin- $\alpha$  Immunohistochemical Expression in Mature and Immature Canine Sertoli and Leydig Cells. *Reprod Domest Anim.* 2011, 46(5):920-923.
- **Banco B**, Antuofermo E, Borzacchiello G, Cossu-Rocca P, Grieco V. Canine ovarian tumors: an immunohistochemical study 1 with HBME-1 antibody. *J Vet Diagn Invest.* 2011; 23(5):977-81.
- **Banco B**, Stefanello D, Giudice C, D'Acerno M, Di Giancamillo M, Grieco V. Metastasizing testicular seminoma in a pet rabbit. Inviato a *J Vet Diagn Invest*, 2011.
- Greci V, Travetti O, Di Giancamillo M, Lombardo R, Giudice C, **Banco B**, Mortellaro CM. Middle ear cholesteatoma in 11 dogs. *Can Vet J.* 2011; 52(6):631-6.

## COMUNICAZIONI ORALI

- Giudice C, **Banco B**, Rondena M, Travetti O, Di Giancamillo M, Mortellaro CM, Finazzi M. Colesteatoma canino: caratteristiche immunoistochimiche ed indice di proliferazione del rivestimento epiteliale. IV Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria, Alberese, Grosseto, 24-25 Maggio 2007.
- **Banco B**, Gerosa E, Giudice C, Veronesi MC, Grieco V. Studio istologico ed immunoistochimico del sertolioma del cane. VI Congresso Nazionale

dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria, Napoli, 15-16 maggio 2009.

- **Banco B**, Bianchessi F, Giudice C, Grieco V. Espressione dell'Anti-Müllerian Hormone (AMH) in cellule del Sertoli mature, immature e neoplastiche di cane. VII Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria, Castelsardo, Sassari, 17-18 Giugno 2010.

#### POSTER

- **Banco B**, Stefanello D, Giudice C, D'Acierno M, Cotti Cometti S, Grieco V. Un caso di seminoma metastatizzante in un coniglio da compagnia. VIII Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria, Padova, 15-17 Giugno 2011.